

ることがわかった(72時間の時点で $P < 0.05$) (Fig. 1).

一方、同じく主としてマクロファージから産生されると考えられるIL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18は、経時的変化を認めなかった(Fig. 2). TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-2はケモカインと同様にCon A刺激後に経時的に増加し、かつリポソーム投与後のものはコントロールより有意に増加した (Fig. 3, 4).

一方、T細胞由来であるIL-4とIL-13は、経時的な変化を認めなかった (Fig. 4). IL-7, IL12p70, GRO/KC(CXCL1), M-CSFも経時的な変化を認めなかった (Fig. 5).

一回目の実験の経時変化を踏まえ、2回目、3回目、4回目の実験では、培養開始後72時間の培養上清中のサイトカイン・ケモカイン濃度のみを測定した。その結果、実験1と同様の結果を得た (data not shown). TGF- β 1は、経時的な変化を認めなかった (Fig. 6).

LPS刺激によるIL-1 β の産生動態は、リポソーム投与の有無に関わらず、同様のdose-response curveを示した (Fig 7).

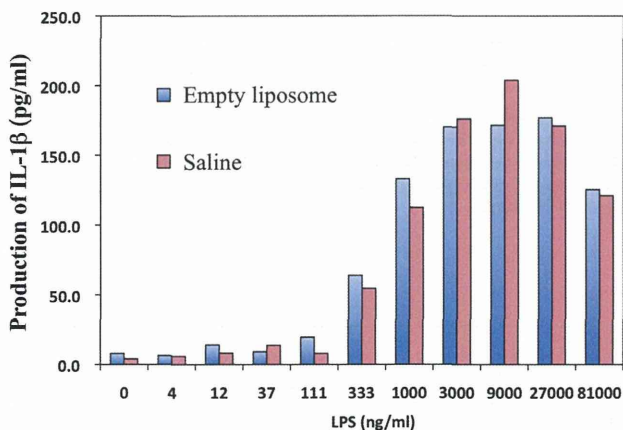


Fig. 7 Saline or liposome loaded spleen cells were cultured for 24 hours in the presence or absence of LPS at the indicated concentration. Then, IL-1 β in the supernatant was assayed in duplicate and mean values were expressed. The same experiment were done three times and representative data was shown.

D. 考察

リポソーム投与後の脾細胞をCon Aで刺激すると、T細胞の増殖が抑制されるが、T細胞の活性化は認められる。今回は、その時のサイトカイン・ケモ

カインの産生動態を明らかにした。リポソーム投与によりCCケモカインの産生は一様に亢進していると思われる(Fig.1). RANTESを除き、これらのケモカインは主としてマクロファージから産生される。この事は、同じく主としてマクロファージから産生されるとされるTNF- α やIL-10の産生も経時的に増加していることと矛盾しないと思われる。一方、CXCケモカインであるGRO/KCは増加しない。実験系においては、RANTESとIFN- γ は、T細胞からの分泌が主と考えられているが、一部の樹状細胞やマクロファージは、RANTESやIFN- γ を産生するpotentialを持つことが知られており、産生の増強が観察されたRANTESやIFN- γ の由来はリポソームを貪食したマクロファージ由来の可能性もある。この事は今後の検討が必要である。

一方、IL-1 α , IL-1 β , IL6, IL-18はいずれも主としてマクロファージから産生される。特にIL-1 α , IL-1 β はマクロファージから産生されるが、CC chemokineと異なり、分泌の亢進は観察されなかった。またIL-1 β は自然免疫系の活性化の指標とされているが、少なくともこの実験系では、リポソームの投与の有無に関わらず自然免疫系の活性化は起こっていないと判断される。この事は、脾細胞をLPSで刺激した系においても、IL-1 β の産生の増強が認められない事 (Fig. 7) と矛盾しない。

T細胞由来のサイトカインIL-2, IL-17Aは、コントロール群およびリポソーム投与群とも産生の増強を認めるが、後者でより顕著に産生が増強されている。この事は、T細胞が増殖はしないが活性化していることを示していると考えられる。特にIL-2は、T細胞の増殖が抑制されているので、コントロールとの差がより顕著に観察されている可能性がある。その一方で、興味ある事に、IL-4, IL-13などのTh2サイトカインの分泌亢進は観察されなかった (Fig 4)。これらの結果は、リポソーム投与により、少なくともIL2産生の抑制はないが、一方で、Th2サイトカインの産生増強はないと想定される。

E. 結論

HbVの投与により、それを捕捉したマクロファージが活性化し、一過性にT細胞の増殖を抑制する機能を獲得する可能性がある。しかしながら、T細胞刺激に反応して活性化し、一部のサイトカイン・ケモカインの産生能は保たれている（一方で、抗体産生には影響を受けない）。またマクロファージの機能の変調はあるものの、自然免疫系の活性化は生じないと思われる。以上より、HbV投与後に免疫学的な変調が一過性に生じる可能性はあるが、それが看過できない問題を引き起こす可能性は少ないと思われる。

17. ヘモグロビン小胞体が免疫系に与える影響の容量依存性の検討と抑制効果軽減の試み

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であるCon A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。しかし、一連の実験結果は、循環血液量の20%v/vという大量のHbVあるいはリポソーム溶液の静注により得られたものであるため、本研究では容量依存性について明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

1. 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時間後に再度等量を投与した場合の影響を検討した。いずれの場合も、投与のあと12時間後に脾臓を摘出し培養実験をおこなった。

2. 脾T細胞増殖抑制能の検討とNitric Oxide (NO)の測定

摘出した脾臓より得られた脾細胞をPBS/1%FCSにて2回洗浄後、 1×10^7 /mLに調整し、5 μ M Carboxyfluorescence diacetate succinimidyl ester (CFSE: Molecular Probes)を加え、37°Cにて5分間細胞を染色した。培養液で洗浄後、24穴平底プレートにduplicateで分注（ 8×10^5 個/1mL/ウェル）し、Concanavalin A (ConA; Sigma-Aldrich)を加え37°C、5% CO₂条件下にて培養した。培養72時間後に細胞

を回収しフローサイトメトリーにて、CFSEで染色された細胞のパターンを解析した。分裂した結果として蛍光の減弱している領域(M1領域)の全体に占める割合を細胞増殖の指標とした。また、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調製した脾細胞浮遊液を、24 well plateに1 mlづつ播種し、Con A (0, 0.3, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)にて3日間培養後、細胞増殖の状態を直接顕微鏡下で観察した。反応系におけるNOの産生量は、Con A存在下で3日間培養した上清を回収し、その上清中のNOをGriess Assay Kit (R & D Systems) によって測定した。

3. L-NMMA(iNOS 阻害薬)あるいはarginine内包リポソームの脾臓T細胞増殖反応への影響

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor (2mM; L-NMMA; Alexis Corp., San Diego, CA)ある

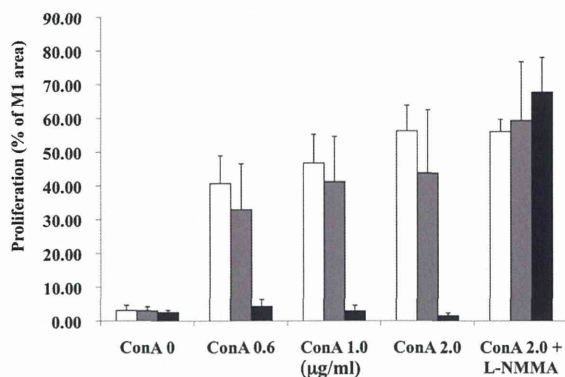


Fig. 8 Dose response inhibitory effect on T cell proliferation

Empty-liposome (□):saline; (■):2%(v/v); (■):5%(v/v) was infused into rat. Then, splenocytes were incubated in the presence of Con A at indicated concentrations. Infusion of 5%(v/v) of empty-liposome into rat was enough to induce the inhibition of rat splenic T cell proliferation. 2%(v/v) of liposome induce only the tendency of inhibition.

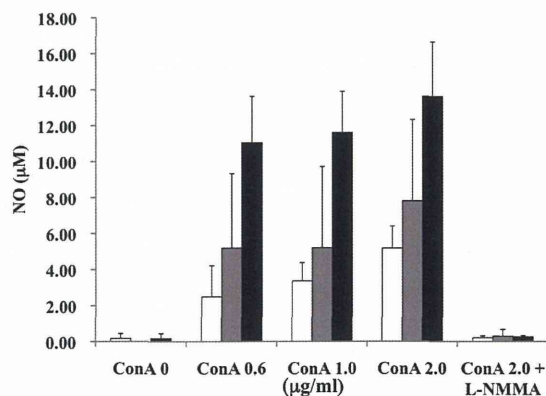


Fig. 9 Dose response inhibitory effect on NO production

Experimental condition was the same as that described in the legend in Fig. 8. Infusion of 2% (v/v) of empty-liposome into rat was enough to inhibit NO production from rat splenic cells stimulated by Con A. The concentration of L-NMMA added in the culture was 2mM.

いはNG-monomethyl-L -arginine の10mMの溶液を作成したのち、それぞれを内包させたリポソーム溶液を作成して、循環血液量の20%(v/v)の容量を投与し、そのT細胞増殖抑制効果およびNO産生に与える影響を、空リポソームの影響と比較検討した。また、脾細胞培養液に加えたL-NMMAは最終濃度が2mMとなるように調整した。

C. 結果

1 容量依存性の検討

脾T細胞の増殖抑制効果は、循環血液量の5%v/v量の投与でも明らかに認められた。しかし、2%v/vでは、抑制の傾向はあるが、明らかな抑制効果はないと判断された (Fig 8). 従って、抑制効果の発現は投与量に依存して現れる事が明らかとなった。この結果は反応系に産生されるNOの量からも裏付けることができた。

また、1%v/v単独投与では抑制効果は認められないが、12時間間隔で1%v/vを2回投与すると抑制効果が発現する事がわかった (Fig. 10).

C.2 iNOS阻害薬あるいはarginine内包リポソームのT細胞増殖抑制効果について

これまでの検討でNOの産生がT細胞の増殖抑制に深く関与していることが明らかになっていることから、リポソームにNO産生に必要なinducible NO synthase (iNOS)のinhibitorであるL-NMMAをあ

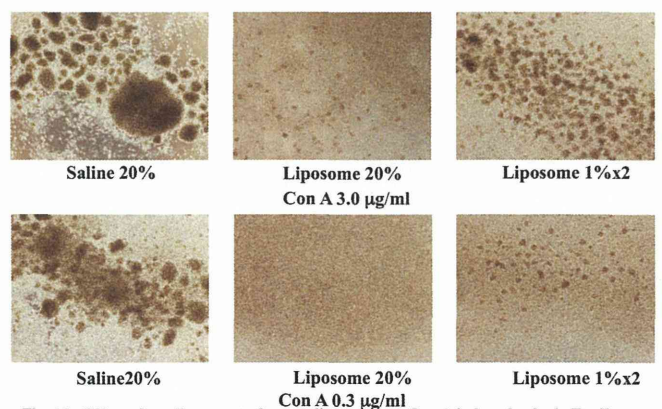


Fig. 10. Effect of small amount of empty liposome on Con A induced splenic T cell proliferation. As previously reported, injection of 20%v/v of liposome clearly suppressed T cell proliferation and no inhibition was observed in case of 2%v/v injection. However, injection of 1%v/v twice at 12 hours interval was shown to suppress T cell Proliferation.

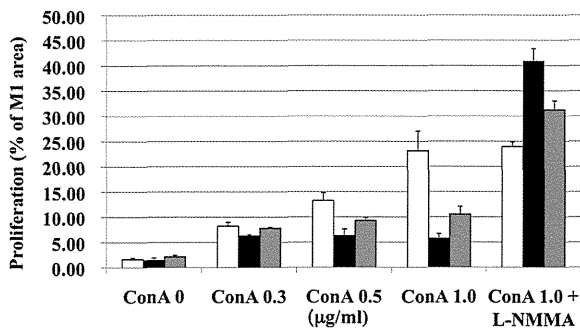


Fig. 11A Reduced inhibition of T cell proliferation by L-NMMA-liposome 20%(v/v) of empty-liposome (■), L-NMMA-liposome (▣) or saline (□) was injected into rats. Then, splenocytes were incubated in the presence of Con A at indicated concentrations. The concentration of L-NMMA encapsulated in the liposome was 10mM. The concentration of L-NMMA added in the culture was 2mM. The addition of L-NMMA in the liposome tended to lift the inhibition of splenic T cell proliferation induced by empty-liposome. Results from one of two independent experiments was shown. Both experiments showed the same results.

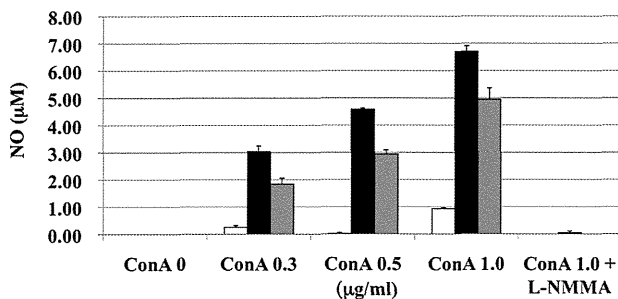


Fig. 11B Reduced production of NO by L-NMMA-liposome Experimental condition was the same as described in the legend of Fig. 11A. The concentration of L-NMMA contained in the liposome was 10mM. The NO production of L-NMMA-liposome loaded splenocytes (▣) was lower than that of empty-liposome loaded splenocytes (■) (P<0.05). Results from one of two independent experiments was shown. Both experiments showed the same results.

あらかじめリポソームに内包しておくことで、抑制誘導効果を軽減できるかどうかを検討した。

L-NMMA内包リポソームによるT細胞増殖抑制効果は、空リポソームと比較すると減弱されている傾向が認められた (Fig. 11A)。これに合わせて、NO産生量についても抑制が認められた (Fig. 11B)。

NOはarginineを基質としてiNOSにより産生されるのであらかじめarginineを内包したリポソームが免疫抑制効果を増強する可能性も検討した (Fig. 12A, 12B)。Arginine内包リポソームは、空リポソームと比較してわずかに増殖抑制効果が増強しており、それを裏付けるようにNOの産生量も空リポソームより高い傾向があった。

D. 考察

循環血液量の20%v/vのリポソーム溶液によりT

細胞増殖抑制効果が認められるが、2%v/vまで減量すると、その傾向は認められるが明らかな抑制効果は観察できなくなった。しかしながら、1%v/vを12時間間隔で2回投与する場合には、明らかな抑制効果が誘導できた。この時、反応系内に産生されるNOの量は、20%v/v投与時より低い、1%v/v 1回投与よりは高いことも示され(data not shown)、観察された抑制効果にNOが関与している事を示唆する結果であった。

リポソーム溶液の脂質濃度は7~8g/dlである。ラットの循環血液量の20%v/v投与するという操作をヒトに換算すると、1回に投与する脂質の量は80gとなる。これはヒトが1回の食事で摂取する脂質のおおよそ20倍に相当する。しかしながら、循環血液量の1%v/vの投与量は脂質4gに相当し、ヒトが1回の食事で摂取する脂質量とほぼ同じである。この事から、脂質の1回の負荷量が正常範囲であっても、反復投与による免疫系への影響は発生しうる可能性があると考えられる。

こうした、抑制効果は、リポソームを捕捉したマクロファージの産生するNOが関与していると推定される事から、iNOSのinhibitorではL-NMMAあるいは、その基質であるArginineを内包したリポソームを用いて、iNOSの産生を制御できると考えその可能性を検討した。その結果、前者ではNOの産生の低下傾向と抑制効果の減弱傾向を、後者ではNO産生の増強傾向と抑制効果の増強傾向を認めたが、いずれも顕著なものではなかった。しかしながら、内包する物質の量を高める事で、より明確な結果が得られる可能性があり、今後の検討が必要と思われる。

E. 結論

リポソーム投与後に認められる一過性の脾T細胞増殖抑制は、ラットに投与するリポソームの容量に依存している。循環血液量の20%v/vから5%v/vまでは、確実に抑制効果が認められるが、1%v/vの容量では抑制効果は認めない。T細胞増殖抑制効果は、

リポソーム内にiNOSの阻害剤あるいはiNOSの基質を包埋する事で,制御できる可能性がある.

18. リポソーム捕捉マクロファージの遺伝子発現プロファイルの検討

A. 研究目的

リポソームを貪食している脾マクロファージの遺伝子発現プロファイルの変化について解析することにより,リポソーム投与の影響を分子生物学的側面から解析することを目的とする.

B. 研究方法

1. 脾細胞からのCD11b/c陽性,HLA-class II陰性細胞の分離とRNAの抽出

磁気ビーズを用いた純化操作によりCD11b/c陽性細胞rich分画を採取した.得られた分画のCD11b/c陽性細胞の割合は,純化前の数%から純化後は50%前後に高めることができた.この細胞からRNAを抽出し,DNAマイクロアレイ解析に用いた.コントロールは生理食塩水を注射したラットから採取し磁気ビーズを用いて純化したCD11b/c陽性細胞を使用した.

2. DNA マイクロアレイによる遺伝子プロファイルの解析

上記のように抽出したRNAをからLow Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies)を用いcDNAの合成とcRNAのラベルと増幅をおこなった.ラベルしたcRNAをマイクロアレイ (whole rat, 44,000 gene, Agilent Technologies) にアプライし,ハイブリダイゼーションをおこなった.マイクロアレイの洗浄と乾燥後,Agilent Technologies Microarray Scannerを用いてスキャンした.得られた数値化データはグローバルノーマライゼーションによってアレイ間の補正をおこなった.生理食塩水 i.v.後とリポソーム i.v.後の結果を比較し,前者と比較して2倍以上発現量の差がみとめられた場合を有意と判定した.

C. 結果

遺伝子発現量をコントロールと比較した結果、2回の実験で2回ともFold increaseが2.6以上であったものが168遺伝子あった。その中から上位6個の遺伝子についての結果を表にした（下表）。

	Exp. 1	Exp. 2
Mmp14	57.2	51.3
Ccl9	37.4	46.43
ApoE	16.8	9.8
IL18bp	11.39	13.1
IL1a	5.6	9.9
CD276	5.27	7.21

D. 考察

表に示した6個の遺伝子発現の増強が再現性をもって認められた。その中で、Membrane metalloproteinase 14 (Mmp14)のメッセージの増強がもっとも顕著であった。Mmp14は古典的経路で活性化されたマクロファージで産生が高まるとされている。このことから、リポソームを捕捉したマクロファージは、活性化した状態にあると推定される。この事は、マクロファージ由来と考えられるCCケモカインおよび一部のサイトカインの産生が一樣に増強していることと矛盾しないと思われる。この結果は、アレイによる発現遺伝子の網羅的解析なので、今後は個々の遺伝子に絞って、その発現量の変化を確かめ、さらに遺伝子の蛋白レベルでの発現に関し検討してゆく必要がある。また、活性に関与するシグナルを伝達する分子のリン酸化状態についても検討し、HbVを構成しているリポソームのもつ薬理作用の詳細を明らかにして行く必要があるだろう。

E. 結論

HbVあるいはそれを構成するリポソームを捕捉する事により、マクロファージが活性化される事が分子生物学的にも示唆された。

19. プリオンについての考え方

A. 研究目的

HbVがヒトhemoglobinを材料としていることから、そのバイオ医薬品としての安全性を論じ、HbVの安全性に理論的根拠を与える。

B. 研究方法

いわゆるBSE (Mad Cow Disease)の発症に続く、vCJDの出現およびその収束の過程を明らかにする。また、我が国における血液製剤のプリオン対策を調べて、現在の血液製剤の安全性を理論的に検証する。

C. 結果および考察

A) 英国に於ける状況

1986年に英国でBSE:狂牛病(Mad Cow Disease)が流行していることが報告された。この原因として、当時牛の飼料として使用されていた肉骨粉に、羊のTransmissible Spongiform Encephalopathy (TSE)であるスクレイピーの原因物質が混入していたことが原因と指摘され、英国では家畜飼料から肉骨粉を排除した。その結果、狂牛病の発生は1992をpeakとして減少してきた。しかし、その4年後の1996年に、若年性のCJDの発生が同じく英国で報告され、それがBSEを発症した牛由来の組織の混入した食品(MRM; mechanically recovered meat)の摂取によるものであることがほぼ確実となり、MRMが禁止された。

vCJDの発症者数は2000年の英国の28人をピークに年々減少してきている。また牛の特定臓器(SBO: specified bovine offal, 脳, 脊髄, 脾臓, 胸腺, 扁桃, 腸)の食品への使用が禁止された1989年以降に生まれたvCJDの患者は確認されておらず、英国に端を発したvCJDの蔓延は防ぎ得た可能性が示唆されている。(GA Mackay et al. The molecular epidemiology of variant CJD. Int J Mol Epidemiol Genet. 2011; 217:181)

の導入である。以下に簡単に説明を加える。

B) 我が国におけるBSEおよびvCJD発生状況

2001年9月に国内で初めてのBSE発生が確認されてから、2009年1月に36頭目が確認され、国内牛では、それが最後となっている。2009年5月には、日本は「BSEがリスク管理されている国」（準清浄国）として国際獣疫事務局(OIE)から認定された。輸入牛肉に関しても、年齢制限と特定危険部位の除去および全頭検査（それが有効性を論じることは避けるが）を実施しており外部から狂牛病感染肉が食物連鎖に入る可能性は極めて低い。

vCJDの国内発生に関しては、2004年にvCJD患者が1名発生したが、英国渡航歴を有していることから国内での感染例ではないと考えられている。即ち事実上、国内でのvCJD発生は報告されていない。

C) vCJDの輸血による感染例について

vCJDが血液を介して感染するか否かは、輸血の世界でも重大な問題として捉えられ、英国において慎重な調査が行われてきた。その結果、現在までに献血後にvCJDと診断されたドナー由来の血液の輸血を受けた受血者4名がvCJDに感染していることが報告されており、異常プリオンが混入した血液製剤によりvCJDに感染する可能のあることが明らかにされている。従って、我が国に於ける輸血によるvCJD感染の予測をすることには意味がある。1)1990年20代の前半の患者が存在し、2)輸血歴や海外渡航歴の有る人の献血制限がなく、3)汚染血液の輸血で必ず発症し、4)輸血による潜伏期間は食事のものと同じという条件で、感染者発生数予測をした場合に、2010年代の前半以降には新たな発症はなく、vCJDを発生する累積患者は0.563となったと報告されている(2)。すなわち、現実には患者発生数は零と考えてよい。

一方、日赤で実際に行われているvCJD対策は以下の二つである。即ち

1) 問診の強化 および 2) Universal Leukoreduction

1) 問診の強化について

献血血液の採血を実施する日赤の水際での対処として、献血前に問診において狂牛病が発生した国での滞在期間が長期にわたることが判明した場合には献血を断る方針を取っていた。特に1980年から1996年間の英国滞在歴が僅か1日でも献血を断るという徹底した対応をとっていた。また我が国の献血基準ではもともと輸血歴のある人の献血は制限していた。

2) Universal Leukoreductionの導入について

プリオン蛋白は主として細胞膜に存在していることから、血液製剤から白血球除去を行えば感染性プリオンの低減が期待される(3)。従って、白血球除去を全製剤で行うこと(Universal leukoreduction)により、vCJD感染に関してより高い安全性の担保が計られると考えられる。実際、Universal leukoreductionの導入に伴って、平成22年1月27日(2010/1/27)より、国は、1980年から1996年間の英国滞在歴に関する献血制限を「1日以上」から「通算1ヶ月以上」へと大幅に緩和した。

この二つの措置を講じている現状は、上記のvCJDの感染予測の条件よりさらに厳しいことになる。従って、現時点では、日本に於ける輸血によるvCJD感染リスクは0.563より低値であることは間違いなく、限りなく零に近いと考えられる。このことは、即ち、HbVに包埋するHb分子の原料として、期限切れヒト由来赤血球を用いている範囲では、異常プリオンが混入する可能も限りなく零に近いと考えて差し支えないことを意味する。

D) プリオン除去行程の導入について

白血球除去以外のプリオン除去法が存在する。すなわち、血漿分画製剤の製造工程に導入されているプリオン除去法があるので、これをヘモグロビン

精製工程に導入すれば、理論的にはさらに安全性を上乗せすることが可能である(4)。しかしながら、cost-benefitを考えると、果たしてその工程が必須であるか否かは議論の余地があると思われる。

一方で、いかなる操作を加えようとも、献血血液を原料として使用する限りは、HbVは特定生物由来製剤であると見なされることから、溯及調査の出来る体制は整える必要があると考える。

D. 結 論

当研究班としては、我が国に於ける献血由来の白血球除去済みの赤血球を原料としている限り、1) その中にvCJDの原因である異常プリオンの混入の可能性を危惧する蓋然性は極めて少なく、献血血液に勝るとも劣らない安全性が担保されている、2) 実際のヘモグロビン精製過程に既知のプリオン除去工程を導入することもできるので更なる安全性の向上を期待できる、と考えている。即ち、特定生物由来製品とみなされるHbVは、vCJD感染予防に関しての十分な安全性を保証することができると考えている。

参考文献

1) GA Mackay et al. The molecular eepidemiology of variant CJD. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2011; 217:181

2) 薬事・食品衛生審議会 平成21年度第3回血液事業部会運営委員会資料「英国渡航に由来するvCJD感染リスクの評価と献血制限のあり方について」. 架 け 橋 正 之 . <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-8o.pdf>

3) Yunoki M, Urayama T, Ikuta K. Possible removal of prion agents from blood products during the manufacturing process. *Future Virol* 2006; 1: 659-674.

4) 柚木,萩原,生田.バイオ医薬品におけるプリオン

の問題 - ヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題-. *人工血液* 18, 142-150 (2010)

20. ヘモグロビン小胞体の出血性ショックにおける有用性に関する研究

A. 研究目的

これまでの多くの研究や臨床診療において心筋機能障害や心不全は遷延する出血性ショックに伴って頻りに認められるとされている。これらは、出血性ショックからの一時的回復後の予後不良及び出血性ショック時の致死的血行動態破綻に関わる。先行研究によると出血性ショックに伴う心筋虚血や心筋低酸素状態が出血性ショック時の致死性心筋機能障害を惹起すると報告されている。出血性ショックの心臓への致命的障害を回避するためには、出血性ショックの心臓への致命的障害を回避するためには、出血性ショックからの迅速な回復や心筋への重篤な虚血や低酸素血症を未然に防ぐ有効な治療が必要である。

また、出血性ショック・蘇生は、心筋全体の虚血・再還流である。さらに、平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生しいわゆる“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈するとも報告されている。しかし、“出血性ショック心臓”の蘇生後の致死性

不整脈出現やその病態に関する検討は少ない。そこで、実験的に30%出血性ショック状態を作成し、5%アルブミン、生理食塩水、洗浄赤血球で蘇生した4群で心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na⁺ channel感受性色素を用いたOptical mapping systemで興奮伝播・活動電位持続時間不均一性及び致死性不整脈誘発性を検討するとともに、人工赤血球(LHb [Hgb=6g] またはHbV [Hgb=10g])のこれらの指標に及ぼす治療効果を検討した。

B. 研究方法

Sprague-Dawley rats (male; 8 weeks old; 250- 300 g; n = 42)の皮下にketamine hydrochloride (5 mg/kg)を投与し麻酔した。麻酔下に気管内挿管し、人工呼吸下で、abdominal aorta catheter挿入、血圧測定するとともにabdominal aorta catheterから脱血し、以下のプロトコールで致死性出血性ショックモデルを作成した(図1)。すなわち、循環血液量25%を15分で脱血、5分間放置後再出血モデルとして、5%を5分かけて再脱血(Total 30% blood loss : 不可逆性Shock)を実施した。その後15分間放置したのち、脱血量と同量①5%アルブミン(5%アルブミン群)、②生理食塩水(生理食塩水群)、③洗浄赤血球(洗

図1

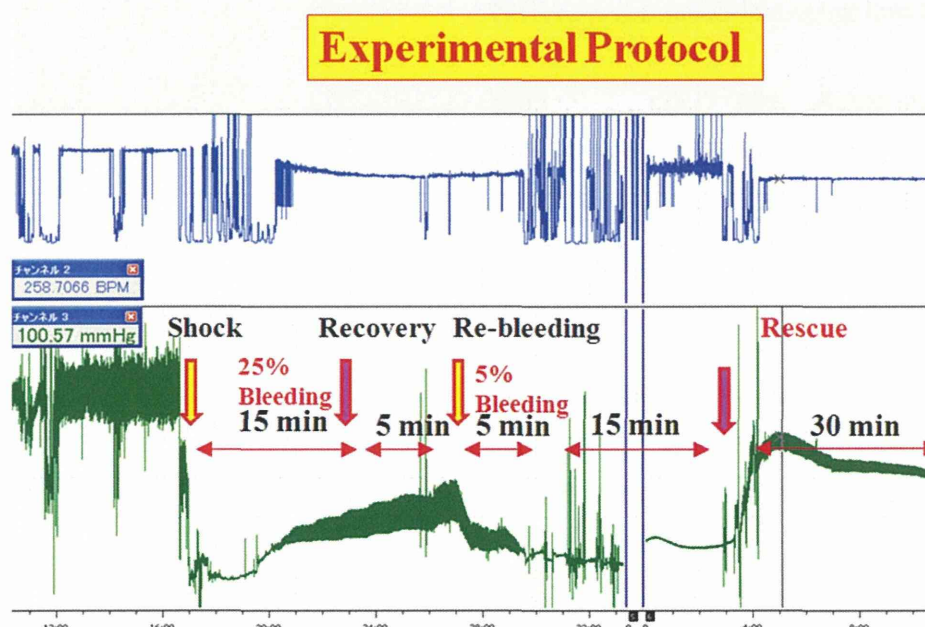
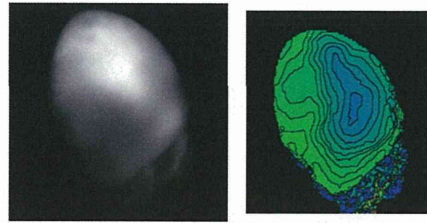
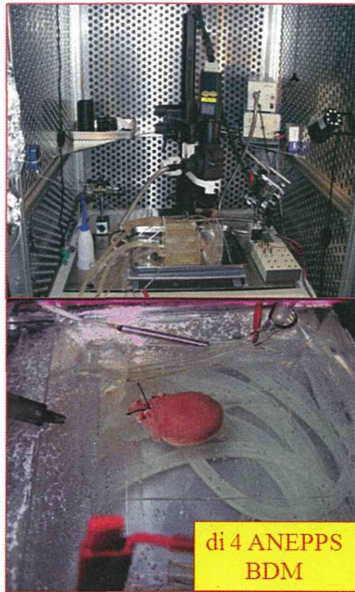
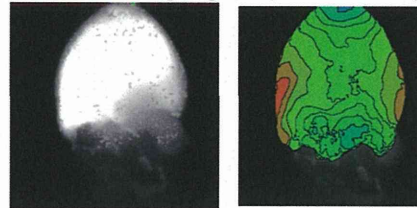


図2 Optical Mapping (Activation Map)

Recording images by CCD camera Cardiac Imaging (Right Ventricle)



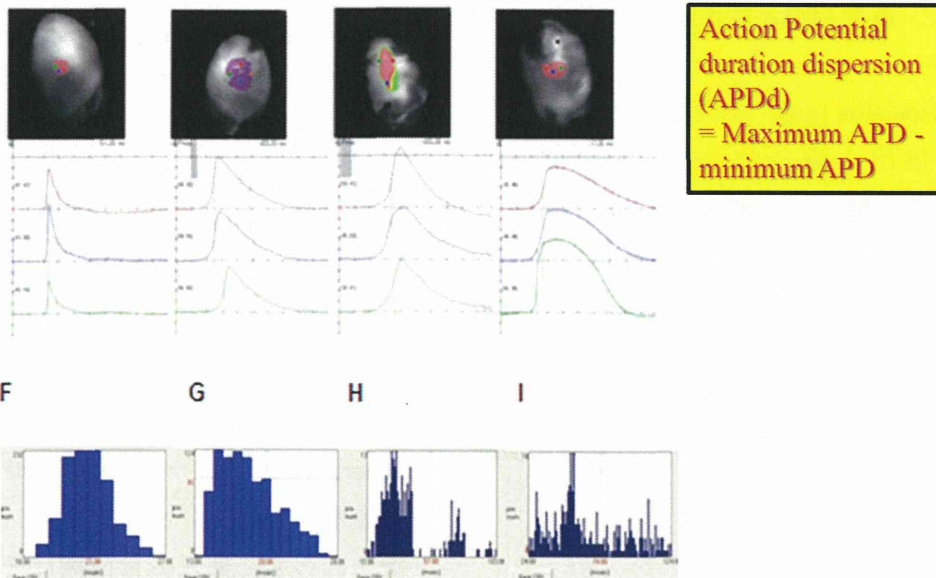
Cardiac Imaging (Left Ventricle)



Normal sinus rhythm

Conduction velocity *pattern (Pacing)

図3 Optical Mapping (Measures of Action Potential Duration Dispersion)



Normal Control Mild Moderate Severe Impairment

浄赤血球群)、④人工赤血球 (人工赤血球蘇生群: LHb [Hgb=6g, n=5] またはHbV [Hgb=10g, n=5]) で蘇生した。また、⑤非蘇生群も対照群として作成した (① - ③、⑤各群、n=8 ; ④群、n=10)。

(1) Optical mapping analysis 法と不整脈誘発法

Ratsを麻酔後、正中切開にて開胸し、迅速に心臓を摘出した。大動脈から冠動脈洞にカニューレを挿入した。酸素化し37度に保温したTyrode溶液 (CaCl₂ [2], NaCl [140], KCl [4.5], dextrose [10],

MgCl₂ [1], and HEPES [10, pH 7.4], in mmol/L) にて直ちに灌流した。さらに、Tyrode溶液を一定容量で灌流している水槽に心臓を固定し、大動脈に挿入したカニューレからNa感受性蛍色素 (di-4-ANEPPS [15 μmol/L]) を約40ml、2分間かけて灌流染色した。さらに、心臓の拍動を停止させるため2,3-butanedione monoxime (Wako Chemical, Tokyo, Japan, 20 mM) を灌流した。Optical mapping analysisはhigh-quality charge couple device (CCD) camera (Leica 10447050, Geneva, Switzerland) を用いて4秒間撮像した。撮像は心筋が洞調律であることを確認してから、左心室、右心室外膜面の興奮伝播時間(ms)と伝播様式、得られた活動電位持続時間(APD)をcommercialized software (Ultima-6006; Sei Media, Inc., Tokyo, Japan)にて解析した (図 2) 殊に、左心室心膜面の約5x5mmの関心部位 (ほぼ左心室自由壁の中央) を任意に設定し、この部位におけるAPDの分布のヒストグラムと、APDの実波形を記録した。APDはAPD 60msを使用した。ヒストグラムより、最大APDと最小APDの差からAPD不均

一性 (APD dispersion [ms]) を決定し、出血性ショック蘇生後摘出心臓における、経時的APD dispersion変化を比較した (図 3)。

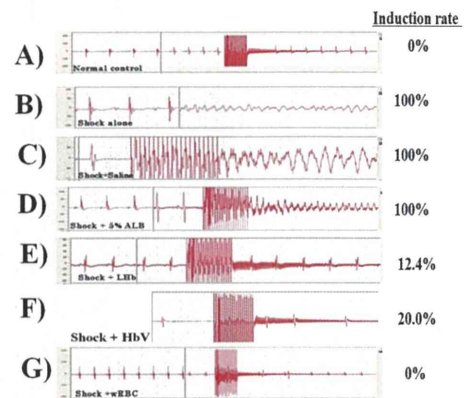
さらに、催不整脈性を調べるために、右心室・左心室の3箇所、すなわち左・右心室心尖部、心臓基部、右室流出路を20回の連続刺激 (burst pacing, 5, 50, 100 V; 40-ms interval, 20 trains) 各voltageにて3回づつ施行し、致死性不整脈の誘発の有無を検討した (図 4 - A)。

(2) 統計学的検討

各群において、興奮伝播時間及びAPD dispersionは平均±標準偏差で表した。興奮伝播様式は異常の有無を、異常有りまたは無しの定性的2分類でその頻度を検討し、致死性不整脈誘発頻度に関しても誘発の有り無しにつき各個体毎に検討し、その頻度を比較した。群間の比較にはANOVA法にて検

図 4

Induction of Lethal Arrhythmias by Burst Stimulation to the Ventricles



定し、Bonferroni post hoc補正を実施した。頻度の検定にはカイ二乗検定を実施した。P<0.05を推計学的に有意とした。

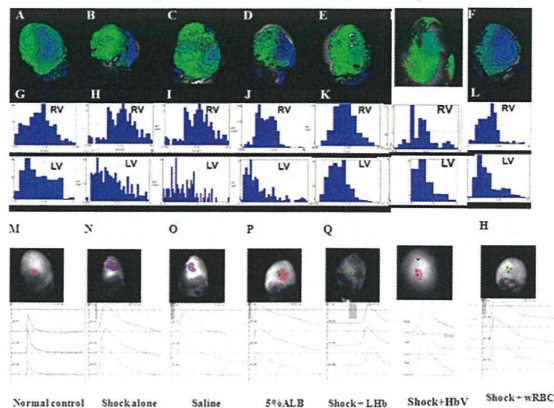
C. 結果

Optical mapping analysis 法による興奮伝播時間・伝播様式及びAPD不均一性と不整脈誘発の結果

非蘇生群では全例Ratsは心室細動または徐脈性不整脈を惹起し、その後心停止を来たした (図 4 - B)。他の3群では、各蘇生液により全Rats血行動態はショック状態から蘇生された。これら各群のRatsから摘出された心臓の興奮伝播時間・伝播様式をOptical mapping systemにて検討した結果を図 5 に示した。

正常Ratsの洞調律における左心室の興奮伝播時間は24±1msであり、伝播様式は図 2 に示した patternであった。一方、5%アルブミン群及び生理食塩水群では、ショック状態から蘇生されたにもかかわらず、興奮伝播時間はそれぞれ、35±3ms及び 39±3msとそれぞれ有意かつ著明に延長しており、伝播様式の明らかに正常 patternと異なっていた (図 5)。しかし、洗浄赤血球群で蘇生したRatsでは、全Rats正常興奮伝播時間 (22±3ms) であり、かつ、正常伝播様式であることが認められた。また、人工赤血球蘇生群でも興奮伝播様式は正常興

図 5 Comparison of Activation Map and Action Potential Duration Dispersion after Hemorrhagic Shock



奮伝播様式であり、人工赤血球蘇生群の興奮伝播時間は正常であった ($23 \pm 5\text{ms}$)。さらにAPD dispersionは、洗浄赤血球群で全Rats、図3で示したnormal controlと差を認めず (normal control vs. 洗浄赤血球群; $14 \pm 2\text{ms}$ vs. $13 \pm 3\text{ms}$, NS)、これに対し、5%アルブミン群及び生理食塩水群では、全Ratsで、図3で示したmoderateまたはsevere impairment patternを示し、APD dispersionはそれぞれ $34 \pm 27\text{ms}$ 及び $38 \pm 9\text{ms}$ と有意 ($P < 0.05$) かつ著明に延長していた。人工赤血球蘇生群のAPD dispersionは洗浄赤血球蘇生群と同様にnormal controlと差は認めなかった ($14 \pm 2\text{ms}$ vs. $18 \pm 7\text{ms}$)。また、活動電位持続時間そのものも正常Rats、洗浄赤血球群及び人工赤血球蘇生群に比較し、5%アルブミン群及び生理食塩水群では著明に延長していることが認められた (図6)。

致死性不整脈の誘発性の検討では、正常Ratsの摘出心臓では通常不整脈が誘発されない両心室へのburst pacing (図4-A)にて、5%アルブミン群及び生理食塩水群蘇生群Ratsでは全Ratsで致死性心室性不整脈 (心室細動・心室頻拍) が容易に誘発された (図4-C、D)。しかし、洗浄赤血球蘇生群及び人工赤血球蘇生群Ratsでは、正常Ratsと同様に致死性不整脈は誘発されなかった (図4-E、F、G)。

D. 考案

今回の実験研究は、“出血性ショック心臓”において、洗浄赤血球蘇生及び人工赤血球蘇生が致死性不整脈誘発の抑制効果があり、その機序として心筋興奮伝播時間と伝播様式・活動電位持続時間の均一性を正常に保つ作用が貢献している可能性があることが示唆された。

本研究では、非蘇生群が全Rats死亡する致死性再出血による血性ショックモデル (30%脱血) を用いた、いわゆる“出血性ショック心臓”において、通常臨床現場で用いられる5%アルブミン蘇生群、生理食塩水蘇生群及び洗浄赤血球蘇生群における致死性不整脈の誘発頻度やその機序を摘出心臓に対するOptical mapping systemとburst pacingによる致死性不整脈誘発法で検討した。その結果、5%アルブミン群及び生理食塩水群では血行動態は正常に復し、蘇生に成功したものの、摘出心臓におけるOptical mapping systemでは興奮伝播異常・再分極不均一性を示すAPD dispersion増加が認められ、致死性不整脈の誘発の頻度が増加していた。これらの異常変化は、洗浄赤血球蘇生群では認められなかった。また、人工赤血球蘇生群でも認められなかった。

これまでの報告では、急性血性ショックに伴い、侵襲の大きさに伴った心筋障害が惹起され、血性ショック早期の死亡率に関与しているとされている。これらの心筋障害には、血流の低下及び貧血による心筋虚血そのものの影響に加え、“出血性ショック心臓”に固有の2次的血流障害や代謝異常が関与する可能性を示唆する報告もある。従って、“出血性ショック心臓”では、単に5%アルブミンや生理食塩水による蘇生では、その回復は不十分と考えられる。洗浄赤血球治療群及び人工赤血球蘇生群で、致死性不整脈やその病因となるOptical mapping system解析指標が正常に保たれた。このことは、血性ショック治療において、血行動態の改善のみならず、貧血を改善することにより“出血性ショック心臓”の心筋組織に充分は酸素供給を

行うことが重要と考えられる。

本研究を、臨床現場における“出血性ショック心臓”の治療に直結させるには充分とはいえないものの、血性ショック後に遷延する血行動態の不安定性や心不全・致死性不整脈の発生予防に、十分な酸素運搬作用が治療上重要であることを示唆する結果と考えられた。

また、これらは本人工赤血球蘇生が臨床的にも有効である可能性を示唆するものである。

E. 結論

出血性ショック心臓では、左心室伝導遅延とAPDd増大を惹起し、電氣的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。洗浄赤血球蘇生と人工赤血球蘇生はこれら指標の保持と予防効果を有した。

【補足】

研究課題：凝固障害を伴う家兎の出血性ショックに対する人工赤血球を用いた蘇生救命輸血の効果 (木下学)

【目的】凝固障害を伴う家兎の出血性ショックに対するHbVによる蘇生救命輸血の効果を検討した。

【方法】家兎(2.5 kg)に脱血と赤血球成分のみの返血を繰り返すことで循環血液量のほぼ2倍に相当する400mlの血液交換を行った。血液交換後に、肝臓に穿孔損傷を作成し臓器出血を起こさせた。damage control (出血局所圧迫)と共に、血小板輸血と凝固因子補充を行なった。止血後にHbV(10ml)を輸血し、家兎の濃厚赤血球を輸血する群、5%アルブミンを投与する群とで24時間後の生存率を比較した。

【結果】400mlの脱血返血後、平均血圧40mmHg、Hb5.8g/dl、血小板数 $40 \times 10^3 / \mu\text{L}$ の貧血と血小板減

少を伴う病態となった。これに肝損傷を作製し血小板輸血と凝固因子補充を行った。平均38分で止血が得られたが、25ml(平均)の臓器出血(損傷から10分間)によりHbが4.8 g/dl程度に低下した。その後の蘇生輸血で、濃厚赤血球群とHbV群は70%が救命出来たが、5%アルブミン群は90%が数時間以内に死亡した。

【結論】凝固障害を伴う臓器出血の病態でもHbVは止血凝固に影響せず出血性ショックを改善し、濃厚赤血球と同等の有用性を示した。

2 1 . 研究発表 (2012.4~2015.3)

A. 酒井 宏水 (研究代表者)

1. 論文発表

原著論文

1. K. Kettisen, L. Bulow, H. Sakai. Potential electron mediators to extract electron energies of RBC glycolysis for prolonged in vivo functional lifetime of hemoglobin-vesicles. *Bioconjugate Chem.* (in press)
1. 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)
2. B. Namgung, S. Cho, P.K. Ong, H. Sakai, S. Kim. Characteristics of the cell-free layer variation under pathological elevation in red blood cells aggregation in narrow tube. *Clin. Hemorheol. Microcirculation* (in press)
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* 35, 6553-6562 (Aug, 2014)
4. 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 (July, 2014)
5. 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)
6. 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).
7. K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Maruyama, M. Otagiri. Fourteen-days observation and pharmacokinetic evaluation after massive intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in cynomolgus monkeys. *J. Drug Metab. Toxicol.* 3, 1000128 (2012)
8. M. Kaga, H. Ohta, Y. Lee, R. Kamii, H. Yamamoto, S. Akiyama, S. Watanabe, T. Matsuda, Y. Kimura, S. Tsuchiya, H. Tei, L. Okamura, H. Sakai, N. Yaegashi. Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusion for 7 days in Pregnant rats and fetuses. *Life Sci.* 91, 420-428 (2012)
9. H. Sakai, Y. Suzuki, K. Sou, M. Kano. Cardiopulmonary hemodynamic responses to the small injection of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 100A, 2668-2677 (Oct. 2012).
10. A.G. Tsai, M. Intaglietta, H. Sakai, E. Delpy, C.D. la Rochelle, M. Rousselot, F. Zal. Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier. *Current Drug Discovery Technol.* 9, 166-172 (2012, Sept)
11. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, K. Kobayashi. Effect of the cellular-type artificial oxygen carrier

Hb-vesicle as a resuscitative fluid for pre-hospital treatment: Experiments in a rat uncontrolled hemorrhagic shock model. *Shock* 38, 153-158 (2012, Aug).

総説など

12. 酒井宏水, 久禮智子. *医学のあゆみ* (印刷中)
13. 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)
14. 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)
15. 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)
16. 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).
17. 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).
18. 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).
19. 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).
20. 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)
21. 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)
22. T. Sato, T. Fukasawa, T. Komatsu, H. Sakai, S. Ishiwata. Protein-protein interactions in solution and their interplay with protein specific functions. *J. Phys. Soc. Jpn* 81 (suppl.), SA002-1 – SA-002-11 (2012)
23. H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics. *Current Drug Discovery Technol.* 9, 188-193 (2012, Sept.)

2. 学会発表

1. T. Sato, O. Glatter, H. Sakai / Hierarchically organized functional particles: static structure and diffusion dynamics of artificial red cells (HbV) and their implication for medical applications / International Association of Colloids and Interface Scientists Conference / Sendai, Japan / 13-18 May 2012
2. H. Sakai, Y. Suzuki, K. Sou, M. Kano / Cardiopulmonary hemodynamic responses to the injection of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs / 9th World Biomaterials Congress / Chengdu / 2012. June 1-5
3. 服部実、小松晃之、酒井宏水、佐藤高彰 / 高分解能小角X線散乱法による水溶性高分子の溶液中における階層的ミクロ構造 / アジア連携分子研研究会 溶液・ソフトマターの新局面：実験及び理論研究手法の開拓と新規物性探索への展開 / 分子科学研究所 / 2012. 6.1-2.
4. 佐藤高彰、小松晃之、酒井宏水、 / 小角X線散乱法を用いた蛋白質溶液への多面的アプローチ-蛋白質間相互作用から立体構造予測まで / アジア連携分子研研究会 溶液・ソフトマターの新局面：実験及び理論研究手法の開拓と新規物性探索への展開 / 分子科学研究所 / 2012. 6.1-2.
5. H. Sakai / Artificial Red Cells (Hemoglobin-vesicles) as a Cellular-type Hemoglobin-based Oxygen Carrier for Versatile Clinical Applications / BIT's 1st Annual International Symposium of Hematology / Beijing / 2012. June 15-17
6. H. Sakai / Gas Bioengineering of Artificial Red Cells (invited) / 28th Annual Conference, on 40th Anniversary of Faculty of Medicine, Prince of Songkla University / Hat Yai, Thailand / 2012, Aug 8.
7. 酒井宏水 / リポソーム製剤としての人工赤血球の効率の高い製造法 / 産学官連携推進会議<第11回>イノベーションジャパン2012 / 東京フォーラム / 2012.9.27-28
8. 酒井宏水 / 人工赤血球/代用血漿剤(水溶性高分子)分散系のレオロジー挙動 / 第60回レオロジー討論会 / 名古屋大学 / 2012.9.27-28.
9. 堀之内宏久、山本尚志、勢司泰久、山本学、泉陽太郎、酒井宏水、小松晃之、小林紘一 / 固形腫瘍組織の酸素加による治療効果の増強 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.
10. 田口和明、酒井宏水、堀之内宏久、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 / 細胞型人工酸素運搬体へヘモグロビン小胞体のカニクイザルへの大量投与の結果からみた実効性 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.
11. J.A. Plock, N. Rafatmehr, E. Tsuchida, H. Sakai, D. Erni / Hemoglobin vesicles and wound healing / / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.
12. 藤原満博、東寛、池田久實、酒井宏水、堀之内宏久、高本滋 / 空リポソームの投与による *ex vivo*でのラット脾臓T細胞の増殖抑制における細胞周期調節タンパクの関与 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.
13. 酒井宏水、鈴木勇司、宗慶太郎、狩野真由美 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)をブタに少量投与したときの血行動態に関する検討 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.
14. 太田英伸、李コウ、加賀麻衣子、田口和明、大柿滋、泉仁美、稲垣真澄、土屋滋、岡村州博、小田切優樹、酒井宏水、八重伸生 / ラット妊娠母体におけるヘモグロビン小胞体の胎盤通過性 / 第19回日本血液代替物学会年次

大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

15. 勢司泰久、堀之内宏久、酒井宏水、小林絃一 / メチレンブルー及びアスコルビン酸を配合した還元剤によるヘモグロビン小胞体の酸素運搬機能延長の試み / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.
16. 酒井宏水、Bing Li / メチレンブルーによるヘモグロビン小胞体の酸素運搬機能持続の機序に関する検討 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.
17. H. Sakai / Recent topics of Artificial Red Cells Project / The 3rd Annual Symposium of Waseda Bioscience Research Institute in Singapore / Biopolis, Singapore / 2012.11.2
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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.
24. 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、小林絃一 / 肺切除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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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
30. 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.
31. 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.
32. 酒井宏水、Li Bing、Lim Wei Lee / 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
33. 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.
34. 木下学、萩沢康介、西川可穂子、柳川鍊平、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・グランドプリンスホテル京都/ 2014. 4.3-5
35. 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)
36. 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
37. 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
38. 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
39. 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
40. 小田切優樹、田口和明、丸山徹、酒井宏水、小林絃一 / 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
41. 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
42. 堀之内宏久、酒井宏水、泉陽太郎、饗庭了、勢司泰久、小林絃一 / 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
43. 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
44. 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
45. 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.
46. 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.
47. 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
48. 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.
49. 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 /
50. 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 /
51. 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 /
52. 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 /
53. 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 /
54. 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 /
55. 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.
56. 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.
57. 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.

58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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