

were repeated 30 times. The temperature of the paste was as low as about 30° C. Kneading was carried out for 180 minutes in total. At that time, the viscosity of the obtained paste at 25° C. was measured using a rheometer (MCR-300, Anton Paar GmbH) to be about 2200 cP (shear velocity at 1000 s⁻¹ at 23° C.), about 10000 cP (shear velocity at 100 s⁻¹ at 23° C.) and about 52000 cP (shear velocity at 10 s⁻¹ at 23° C.). Then, the hemoglobin vesicles were collected in a manner similar to that of Example 1, and it was found that the encapsulation efficiency was about 74% and the particle size was about 280 nm. It was concluded that this was a kneading condition suitable for suppressing temperature rise of the paste and reducing protein denaturation, although kneading time became longer by slowing down the rates of revolution and rotation.

Comparative Example 4

[0053] A complex lipid similar to that of Example 1 but without DHSG was prepared. DPPC, cholesterol and DSPE-PEG5000 with a molar ratio of 5:4:0.03 and a total weight of 10 g were dissolved in t-butanol in a 0.5 L eggplant shaped flask. The complex lipid powder was obtained by freezing with a dry ice/methanol mixed refrigerant and applying to a freeze-drying machine (TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD., FD-1000) for 24 hours. Ten grams of the powder was put in a cylindrical container made of Teflon (registered mark), and supplemented with highly purified human hemoglobin solution (HbCO form bound with carbon monoxide, 45 g/dL, 0.4 dL, pH 7.4). Kneading was carried out in a manner similar to that of Example 3. The encapsulation efficiency was only 26% and the weight ratio of hemoglobin to lipid was a remarkably low value of 0.94. Accordingly, DHSG was found to be indispensable to increase recovery yield of hemoglobin in the experiments to encapsulate hemoglobin described in the present application. Although the effect of DHSG on recovery yield of hemoglobin is clarified as in the above description, there is a possibility that the effect of DHSG on the recovery yield might be affected by the species of the functional substance to be encapsulated and kneading conditions. The present invention, therefore, does not intend to exclude the use of complex lipid powder which does not comprise DHSG.

Example 4

[0054] Pyridoxal 5'-phosphate of 2.5-fold moles with respect to carbonyl hemoglobin was added to a solution of carbonyl hemoglobin. Ten grams of complex lipid obtained by the CRUX method as described in Example 3 was added to 0.4 dL (45 g/dL, pH7.4) of the hemoglobin solution, and kneading with a kneading machine (rotation and revolution mixer, THINKY CORPORATION, ARE-310, revolution at 1000 rpm and rotation at 400 rpm) for 6 minutes and cooling for 3 minutes were repeated 30 times in a manner similar to that of Example 3. Kneading was carried out for 180 minutes in total. The encapsulation efficiency was about 65% and the particle size was about 250 nm. Removal of carbon monoxide and oxygen was performed as described in connection with Example 1, and aliquots of 0.50 dL were dispensed in 1 dL vials. Then, beta-propiolactone was added at a concentration of 0.5% or lower to complete sterilization.

Example 5

[0055] In a manner similar to that of Example 1, a complex lipid powder was prepared by Nippon Fine Chemical Co.,

Ltd. with DPPC, cholesterol, DHSG and DSPE-PEG 5000 dissolved in an organic solvent at molar ratio of 5:4:0.9:0.03, and the organic solvent being rapidly evaporated by the CRUX method. In this example, the concentration of hemoglobin bound to carbon monoxide was reduced to 40 g/dL. Ten grams of the complex lipid powder was added to 0.4 dL of a hemoglobin solution, and kneading with a kneading machine (rotation and revolution mixer, THINKY CORPORATION, ARE-500, revolution at 800 rpm and rotation at 784 rpm) for 30 minutes was repeated 3 times. Kneading was carried out for 90 minutes in total. Then, the paste was diluted with saline in a manner similar to that of Example 1 and the precipitates were removed by centrifugation (3000 rpm, 30 min.). The supernatant was separated by ultracentrifugation to collect hemoglobin vesicles, which were dispersed again to obtain a hemoglobin vesicle dispersion. The encapsulation efficiency was about 80% and the particle size was about 280 nm.

Comparative Example 5

[0056] The amounts of lipids and hemoglobin were increased two-fold compared to those of Example 5. Twenty grams of complex lipid powder and 0.8 dL of hemoglobin solution (40 g/dL) were put in the container described in connection with Example 1, and kneading was carried out for 90 minutes in total in the manner described in connection with Example 5. Then, the paste was diluted with saline in a manner similar to that of Example 1 and the precipitates were removed by centrifugation (3000 rpm, 30 min.). The supernatant was separated by ultracentrifugation to collect hemoglobin vesicles, which were dispersed again to obtain a hemoglobin vesicle dispersion. As the encapsulation efficiency was reduced to about 50%, it was shown that the yield varied depending on the amount of materials placed in the container.

Example 6

[0057] In this example, a condition was examined that used the same amount of lipids and hemoglobin as Comparative Example 5, but in a larger container. 20 g of the complex lipid powder and 0.8 dL of hemoglobin solution (40 g/dL) were put in a container larger than the one described in Example 1 (outer diameter: 90 mm; height: about 108 mm), kneading with a kneading machine (rotation and revolution mixer, THINKY CORPORATION, ARE-500, revolution at 800 rpm and rotation at 784 rpm) for 30 minutes was repeated 3 times or 90 minutes in total. Then, the paste was diluted with saline in a manner similar to that of Example 1 and the precipitates were removed by centrifugation (3000 rpm, 30 min.). The supernatant was separated by treatment with ultrafiltration membrane (molecular weight cut-off: 1000 kDa; membrane area: 0.1 m²; Biomax V screen, EMD Millipore Corporation) to remove hemoglobin which was not encapsulated and to obtain a hemoglobin vesicle dispersion. The encapsulation efficiency was about 75%. As the strongest shear stress was generated on the contact area of the paste and the inner wall of the rotating container, the large area of contact was considered to be effective in improving encapsulation efficiency.

Example 7

[0058] In this example, PMPC, which has a lower phase transition temperature than DPPC, was used as a phosphatidylcholine-type phospholipid. PMPC, cholesterol, DHSG and SDPE-PEG5000 with a molar ratio of 5:4:0.9:0.03 were

dissolved in t-butanol, and freeze-dried to obtain 4 g of dried lipid powder. The powder was supplemented with dense hemoglobin solution (40 g/dL, 0.2 dL), and production of hemoglobin vesicles was attempted in the same manner as in Example 1. After kneading for 3 minutes with the kneading machine (rotation and revolution mixer, THINKY CORPORATION, ARE-310, revolution: 1500 rpm; rotation: 600 rpm) was repeated 30 times, the solution was diluted 4 fold with saline and centrifuged (2000 rpm, 60 minutes). The amount of precipitate in large particle size fraction which was not completely dispersed was significantly reduced compared with Example 1. The particle size was 200-300 nm, which means that the particle size was controlled to be smaller. Thus, it was judged that production is facilitated when a phosphatidylcholine-type phospholipid with a lower phase transition temperature is used.

Example 8

[0059] Stability was evaluated for the hemoglobin vesicles prepared in Example 1 with the complex lipid comprising DPPC as the major component and the hemoglobin vesicles prepared in Example 7 with the complex lipid comprising PMPC as the major component. Washed rat red blood cells were used as a comparison. For each evaluated sample, the hemoglobin concentration was adjusted to 3 g/dL and the percentage of hemolysis was measured after following treatments: (1) freezing with liquid nitrogen and subsequent thawing; (2) 5-fold dilution with distilled water; (3) hydrolysis of phospholipid by phospholipase A2; and (4) fluid movement under shear stress with a shear velocity of 1000 s^{-1} for 2 hours. The hemoglobin vesicles or red blood cells were precipitated by ultracentrifugation and the percentage of hemolysis was calculated from hemoglobin concentration and the volume of the supernatant. N=3, or triplicate samples were prepared for each treatment, and average values \pm standard deviation were calculated. After treatment (1), $75.9 \pm 9.2\%$ of the red blood cells were hemolytic, while $33.7 \pm 4.7\%$ of the DPPC-based hemoglobin vesicles and $33.3 \pm 4.2\%$ of the PMPC-based hemoglobin vesicles were hemolytic. After treatment (2), the red blood cells were highly hemolytic at $89.0 \pm 6.6\%$ while the DPPC- and PMPC-based hemoglobin vesicles were less hemolytic at $0.9 \pm 0.4\%$ and $0.6 \pm 0.4\%$, respectively. After treatment (3), $6.9 \pm 1.3\%$ of the red blood cells were hemolytic, while $0.9 \pm 0.7\%$ of the DPPC-based hemoglobin vesicles and $0.5 \pm 0.1\%$ of the PMPC-based hemoglobin vesicles were hemolytic. After treatment (4), $4.8 \pm 0.3\%$ of the red blood cells were hemolytic, while less than 1% of the DPPC- and PMPC-based hemoglobin vesicles were hemolytic. Thus, it was shown that both of the DPPC- and PMPC-based hemoglobin vesicles are structurally extremely stable. Although DPPC and PMPC have different phase transition temperatures, it was also shown that there are no notable differences in the stabilities of DPPC- and PMPC-based hemoglobin vesicles.

Example 9

[0060] As a model of low molecular weight functional substances, a fluorescent compound 5 (6)-carboxyfluorescein (CF) solution was prepared by dissolving CF at 10 mM in a phosphate buffered solution (pH 7.4). A complex lipid powder was prepared by Nippon Fine Chemical Co., Ltd. with DPPC, cholesterol, DHSG and DSPE-PEG 5000 dissolved in an organic solvent at molar ratio of 5:4:0.9:0.03, and the

organic solvent being rapidly evaporated by the CRUX method. Ten grams of the complex lipid powder was added to 40 mL of the CF solution, put in the cylindrical container described in connection with Example 1 and kneading with a kneading machine (rotation and revolution mixer, THINKY CORPORATION, ARE-310, revolution at 1000 rpm and rotation at 400 rpm) for 6 minutes and cooling for 3 minutes were repeated 30 times. After the repeated kneading and cooling, a paste like a hand cream was obtained. Viscosity of the paste at 25° C . was measured using a rheometer (MCR-300, Anton Paar GmbH) to be about 1020 cP (shear velocity at 1000 s^{-1} at 23° C .), 4600 cP (shear velocity at 100 s^{-1} at 23° C .) and about 36800 cP (shear velocity at 10 s^{-1} at 23° C .). About 1 g of the resulting paste was supplemented with about 10 mL of saline and mixed by shaking to obtain a vesicle dispersion. The vesicles were precipitated by ultracentrifugation ($100000 \times g$, 1 hour). The resulting supernatant CF concentration and volume, as well as CF concentration and the entire volume before the ultracentrifugation, were used to calculate encapsulation efficiency of CF as 85%. The average particle size of the vesicle was 800 nm. It was considered that the reason why the particle size was not sufficiently small was because the viscosity of the CF solution was lower than that of the hemoglobin solutions and the shear stress was not strong enough. It was concluded to further extend kneading time in order to control the particle size to be smaller.

[0061] Although the above Examples describe methods for producing vesicles encapsulating hemoglobin and vesicles encapsulating a fluorescent compound (FC), the substance to be encapsulated is not limited to hemoglobin or CF. Vesicles encapsulating various functional substances may be produced. For example, as disclosed in the Japanese translation of PCT international application No.: 2008-542360, vesicles may be produced which encapsulate pharmaceutical reagents to be applied for treatment, prevention, diagnosis and the like of disease conditions or therapeutics as a functional substance. The functional substance may be a pharmaceutical reagent, such as one which is selected from a group of anti-virus agents, anti-microbe agents, anti-bacterium agents, anti-fungus agents, anti-neoplasm agents, anti-inflammatory agents, radiolabelling agents, radiopaque compounds, fluorescent compounds, pigment compounds, polynucleotides, anticancer agents, cell growth factors, hematopoietic factors (erythropoietin, G-CSF), physiologically active substances, and the like. The lipids which encapsulate these substances may be those described above, or others which are suitable for any of these agents and therapeutics. In case of a functional substance which has poor water-solubility or a low molecular weight functional substance, a special treatment may be employed such as absorbing or fixing by chemical bonding to a water-soluble polymer (such as albumin, gelatin, etc.), followed by stably encapsulating the aqueous solution dissolving a complex of the water-soluble polymer-functional substance in vesicles. As with the examples of functional substances described below, in case of a functional substance which has a poor water-solubility or a low molecular weight functional substance, it is possible to stably encapsulate the functional substance in the vesicles, by using an auxiliary substance such as a water-soluble polymer to disperse the functional substance in the water. As for a lipophilic functional substance which is hardly water soluble with the above-mentioned means, it is in principle possible to first mix the lipophilic functional substance with powder of lipid compos-

ing vesicles, to disperse the mixture in water, and to form vesicles very efficiently by the kneading procedure.

Example 10

[0062] Albumin physically absorbs various lipophilic functional substances, and thus has a potential to be a carrier for the various lipophilic functional substances. In this example, therefore, vesicles encapsulating a dense albumin solution were prepared. Ten grams of the lipid mixture of DPPC, cholesterol, DHSG and PEG-DSPE described in connection with Example 1 in a molar ratio of 5:4:0.9:0.03 was put in the cylindrical container described in connection with Example 1. Then, 40 mL of human serum albumin (Baxter International Inc., 25 g/dL) was added and kneading with a kneading machine (rotation and revolution mixer, THINKY CORPORATION, ARE-310, revolution at 1000 rpm and rotation at 400 rpm) for 6 minutes and cooling for 3 minutes were repeated 30 times. Cooled saline, 120 mL, was added to the obtained paste and kneading was carried out for a minute to reduce viscosity. Vesicles were precipitated by ultracentrifugation (50,000xg, one hour) and albumin which was not encapsulated was removed. The precipitated vesicles were dispersed again to obtain vesicles encapsulating albumin.

Example 11

[0063] In this example, vesicles carrying curcumin as a lipophilic functional substance were prepared. DMPC, cholesterol, DHSG, PEG-SDPE and curcumin in a molar ratio of 5:1:1:0.03:1 were dissolved in heated t-butyl alcohol and freeze dried to obtain a powder mixed with curcumin and lipids. 20 g of the mixed powder was put in the cylindrical container described in connection with Example 1, supplemented with 0.8 dL of phosphate buffered saline (pH 7.4) and kneaded with a kneading machine (rotation and revolution mixer, THINKY CORPORATION, ARE-500, revolution at 800 rpm and rotation at 784 rpm) for 150 minutes in a nitrogen atmosphere to obtain a vesicle dispersion carrying curcumin.

[0064] Specific examples of anti-virus agents include oseltamivir phosphate and indinavir sulfate. Anti-microbe agents include anti-bacterium agents such as ciprofloxacin, cefotetan and azithromycin, anti-fungus agents such as amphotericin B, nystatin and ketoconazole and anti-tuberculosis agents such as isoniazid, streptomycin and rifampin. Agents for stimulating bone growth or that protect against bone loss such as vitamin D, calcium, PTH antagonists or bisphosphonates are also contemplated.

[0065] Anti-neoplasm agents are also contemplated as agents for delivery by the materials of the present invention. A wide variety of chemotherapeutic agents may be used in accordance with the present invention. The term "chemotherapy" refers to the use of agents to treat cancer. A "chemotherapeutic agent" is used to connote a compound or composition that is administered in the treatment of cancer. These agents or drugs are classified by their mode of intracellular activity, for example, whether and at what stage they affect the cell cycle. Alternatively, an agent may be characterized based on its ability to directly bind to DNA, to intercalate into DNA, or to induce chromosomal and mitotic aberrations by affecting nucleic acid synthesis. Most chemotherapeutic agents fall into the following categories: alkylating agents, metabolic antagonists, antitumor antibiotics, mitotic inhibitors, and nitrosoureas.

[0066] Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan); bryostatin; callystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlor-naphazine, chlorophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosoureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, and ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e.g., calicheamicin, especially calicheamicin gamma 1 and calicheamicin omega 1; dynemicin, including dynemicin A; bisphosphonates, such as clodronate; esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antibiotic chromophores, aclacinomycins, actinomycin, anthracycline, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carubicin, caminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-nor-leucine, doxorubicin (including morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; metabolic antagonist such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmoifur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglutase; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; eniluracil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elformithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitraerine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; podophyllinic acid, 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK (polysaccharide complex); razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxoids, e.g., paclitaxel and docetaxel; chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum coordination complexes such as cisplatin, oxaliplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; eto-

poside (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; novantrone; teniposide; edatrexate; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; irinotecan (e.g., CPT-11); topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid; capecitabine; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. In particular embodiments, the chemotherapeutic agent is selected from a group consisting of doxorubicin, topoisomerase I inhibitors such as topotecan and irinotecan and mitotic inhibitors such as paclitaxel and etoposide, and metabolic antagonists such as methotrexate and monoclonal antibodies such as rituximab.

[0067] Stimulators of red blood cell production are also contemplated for delivery, and include iron, epoetin alfa, and filgrastim. Agents for protecting bone marrow from radiation and chemotherapy induced damage are also contemplated, and include amifostin, natural antioxidants such as vitamin E and phenol and contemplated natural products such as curcumin as well as methotrexate rescue agents such as leucovorin.

[0068] The pharmaceutical reagent may be an agent used to remove heavy metals from bone marrow, such as pentetate calcium trisodium. Anti-inflammatory agents such as prednisone, hydrocortisone, aspirin, indomethacin, celecoxib, and ibuprofen are also contemplated for delivery, as are radiolabeled agents such as ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{186}Re , and ^{188}Re . Radioopaque compounds such as iodine-containing CT contrast agents are also contemplated for delivery, as are MRI diagnostic agents such as gadopentetate dimeglumine.

[0069] The following reagents may be used as a functional substance: an ossification promoting agent; a bone disease preventing or treating agent; a fracture preventing or treating agent; a chondrogenesis promoting agent; a cartilage disease preventing or treating agent, or a preventing or treating agent for cartilage diseases such as osteoarthritis, or chronic joint rheumatism; a treating or diagnostic agent for cartilage injuries such as fracture, dislocation and bone breakage, inflammatory diseases such as periostitis, tuberculous arthritis, syphilitic bone inflammation, bone deformation due to Hansen disease, actinomycosis, blastomycosis and brucellosis, tumors such as benign osteoma, osteochondroma, osteoid osteoma, multiple osteocartilaginous exostosis, solitary bone cyst, giant cell tumor of bone, fibrous bone dysplasia, histiocytosis X of bone, parosteal osteosarcoma, osteosarcoma, chondrosarcoma, fibrosarcoma of bone, Ewing sarcoma, multiple myeloma and bone metastasis of cancer, metabolic and endocrine diseases such as rickets, osteomalacia, scurvy, hyperthyroidism, Paget disease, abnormal pituitary function, iron deficiency anemia, fibrochondritis, renal osteodystrophy, osteoporosis, bone defect and rigidity myelitis, or acquired skeletal dysplasia or malformation syndromes such as achondroplasia, acranioleiodoplasia, deforming osteodysplasty, dysosteogenesis, osteopetrosis, craniosynostosis, dens hypoplasia, Klippel-Feil syndrome, rachischisis, hemivertebra, bone abnormality-spondylosis deformans, scoliosis, and Perthes disease.

[0070] The vesicles of the present invention can also be preferably used for highly efficient delivery of treating or diagnostic agents for bone marrow diseases such as osteomyelitis, myeloid leukemia, multiple myeloma, dyshematopoiesis, iron deficiency anemia, pernicious anemia, megaloblastosis, hemolytic anemia, hereditary spherocytosis, drepanocytic anemia and aplastic anemia; or delivering erythropoietin produced by genetic recombination as a drug for remedying renal disease-associated anemia; therapeutic agent for granulocy-

topenia used in carcinostatic therapies, and colony-stimulating factor (CSF) applied to bone marrow transportation and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Examples of therapeutic agents for myelogenous tumors include cytarabine, daunorubicin, idarubicin, aclarubicin, mitoxantrone, enocitabine, 6-mercaptopurine, thioguanine, azacytidine, amsacrine, steroid, arsenious acid, hydroxycarbamide, hydrea, cytosine arabinoside, anthracycline medicines, retinoic acid, vinca alkaloid medicines, predonine, L-asparaginase, interferon, melphalan, vincristine, adriamycin, endoxan, methotrexate, thalidomide, etoposide, cyclophosphamide, carmustine, dexamethasone, cytokine, interferon formulations, busulfan, hydroxyurea, mesyl acid imatinib, prednisolone and bortezomib.

[0071] The functional substance may be used as a diagnostic agent for bone or bone marrow diseases in the case that it carries a gamma emitting or positron emitting radioisotope. The functional substance may also carry therapeutic radionuclides (Auger electron, beta emitting or alpha particle emitting) for radionuclide therapy of bone or bone marrow diseases. Further, the functional substance may be used as a diagnostic agent for X-ray and X-ray computed tomography, in the case that it carries a radio-opaque agent. The functional substance may be used as a diagnostic agent for magnetic resonance imaging, in the case that it carries a superparamagnetic or paramagnetic agent. In addition, since the functional substance can carry a gene and introduce it into the bone marrow with high efficiency, the functional substance can transport, e.g., a drug tolerant gene to the bone marrow to protect the bone marrow in an auxiliary therapy for therapy using an anticancer agent.

[0072] The embodiments above are some of the many possible embodiments which illustrate the application of the principle of the present invention. Other numerous and various modifications are readily composed without departing from the spirit of the present invention.

1. A method for producing vesicles encapsulating a functional substance, comprising the steps of:

- (a) putting the functional substance, lipid and water in a cylindrical container; and
- (b) producing lipid vesicles which comprise the lipid as a main component and which encapsulate the functional substance therein, by kneading the contents of the container with simultaneous rotational movement of the container around its center axis together with revolutionary movement of the container about a predetermined axis of revolution.

2. The method according to claim 1, wherein the contents contained in the cylindrical container in step (a) are prepared by adding the lipid in an aqueous solution comprising the functional substance.

3. The method according to claim 1, wherein the contents contained in the cylindrical container in step (a) are prepared by dispersing a lipid powder in the water, the lipid powder being obtained by drying the lipid comprising the functional substance.

4. The method according to claim 1, wherein the functional substance is hemoglobin and the aqueous solution of step (a) is prepared by adding 15 g or more of a complex lipid powder as the lipid per 1 dL of an aqueous solution of hemoglobin in which 30-50 g/dL of hemoglobin is dissolved.

5. The method according to claim 1, 2, 3 or 4, wherein in step (b), the aqueous solution is kneaded by revolving and rotating the cylindrical container at a rate of revolution for the

cylindrical container of 200-300 rpm and at a rate of rotation for the cylindrical container of 100-3000 rpm.

6. The method according to claim 1, further comprising the steps of:

(c), after step (b), adding water or saline to a liquid or paste in the cylindrical container; and

(d), after step (c), reducing the viscosity of the liquid or paste in the cylindrical container by further rotating the container around the center axis while revolving the container about the predetermined axis of revolution.

7. The method according to claim 6, further comprising a step

(e), after step (d), removing the functional substance which is not encapsulated in the lipid by applying an ultrafiltration membrane technique or ultracentrifugation technique to the fluid or paste in the cylindrical container.

8. The method according to claim 1, wherein, in step (b), the step of kneading the aqueous solution by rotating the cylindrical container around the center axis while the cylindrical container revolves about the predetermined revolution axis is implemented multiple times, and during the interval between two consecutive kneading steps, a cooling treatment is performed to cool down the fluid or paste by stopping at least one of rotation and revolution of the cylindrical container or by reducing the rate of at least one of rotation and revolution of the cylindrical container.

9. The method according to claim 1, wherein the cylindrical container has multiple concave-curved surfaces on the inner periphery of its sidewall and the centers of curvature of adjacent concave-curved surfaces are at different positions, whereby a convex-shaped crest that protrude towards the interior of the cylindrical container is formed between the adjacent concave-curved surfaces.

10. A method for producing vesicles encapsulating a functional substance, comprising the steps of:

(a) adding lipid to an aqueous solution of the functional substance in which the functional substance is dissolved in water, wherein the viscosity of the aqueous solution of the functional substance is 4cP or higher as measured at 23° C. under a condition of shear velocity at 1000 s⁻¹; and

(b) encapsulating the functional substance with the lipid by kneading a mixture prepared in step (a), wherein the viscosity of the kneaded mixture is 1000P or higher as measured at 23° C. under a condition of shear velocity at 1000 s⁻¹.

11. The method according to claim 4, wherein the hemoglobin is carbonyl hemoglobin with its heme at a divalent iron state or deoxyhemoglobin with its heme in a ferrous state.

12. The method according to claim 4, further comprising a step of

removing contaminating unstable proteins by degeneration with a treatment that heats the aqueous solution of hemoglobin to 50° C. or higher for five hours or longer before adding the lipid to the aqueous solution of hemoglobin, and removing the contaminating unstable proteins with an ultrafiltration membrane or centrifugation, wherein

the removing step is implemented in order to reduce the occurrence of insoluble matter of the degenerated protein in the course of the kneading treatment in step (b).

13. The method according to claim 1, wherein the lipid is comprised of a phosphatidylcholine-type phospholipid, cholesterol, a negatively-charged lipid, and a lipid bound with polyethylene glycol.

14. The method according to claim 1, wherein the lipid is comprised of a phosphatidylcholine-type phospholipid of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine, cholesterol, a negatively-charged lipid of 1,5-O-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate, and a lipid bound with polyethylene glycol of 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-Poly(oxyethylene)5000 (molecular weight of the polyethylene glycol chain: 5,000).

15. The method according to claim 13, wherein the gel-liquid phase transition temperature of the phosphatidylcholine-type phospholipid is 30° C. or lower.

16. The method according to claim 1, comprising a step of producing dried lipid powder from a lipid lamellar gel as the lipid, wherein the step of producing the dried lipid powder comprises steps of:

producing an aqueous solution of the lipid by adding 15 g/dL or more of the lipid powder in pure water which is comprised of substantially no solute;

kneading the aqueous solution of lipid within a cylindrical container, rotating the container around its center axis together with revolving the container about a predetermined axis of revolution; and

obtaining the dried lipid powder from the lipid lamellar gel by freeze-drying the kneaded aqueous solution of lipid.

17. The method according to claim 10, further comprising a step of

removing contaminating unstable proteins by degeneration with a treatment that heats the aqueous solution of hemoglobin to 50° C. or higher for five hours or longer before adding the lipid to the aqueous solution of hemoglobin, and removing the contaminating unstable proteins with an ultrafiltration membrane or centrifugation, wherein

the removing step is implemented in order to reduce the occurrence of insoluble matter of the degenerated protein in the course of the kneading treatment in step (b).

18. The method according to claim 7, comprising a step of after (e), adding beta-propiolactone to the fluid or paste that is obtained after removing the functional substance which is not encapsulated in the lipid.

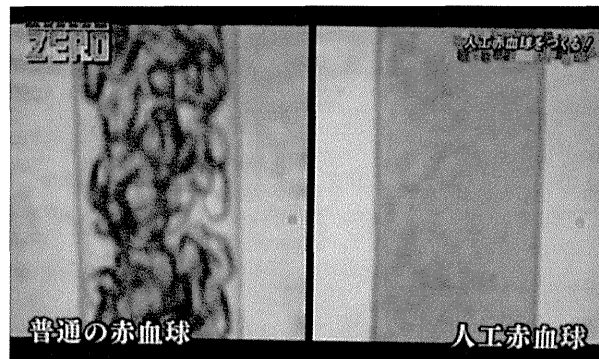
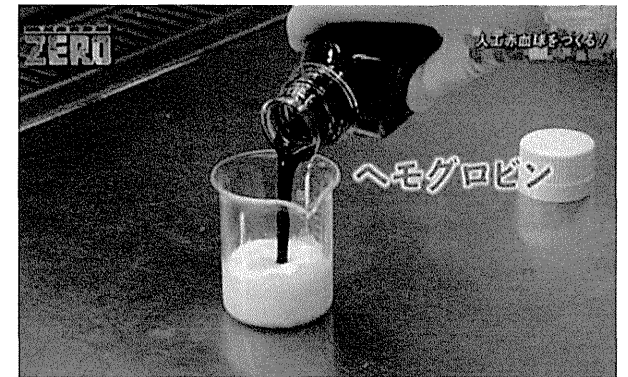
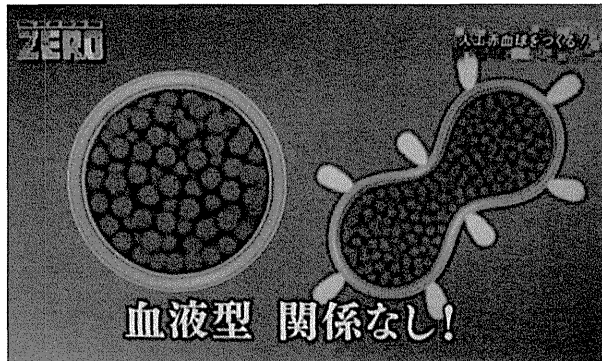
19. The method according to claim 10, comprising a step of after (e), adding beta-propiolactone to the fluid or paste that is obtained after removing the functional substance which is not encapsulated in the lipid.

20. A vesicle comprising of a phosphatidylcholine-type phospholipid, cholesterol, and a lipid bound with polyethylene glycol, wherein the gel-liquid phase transition temperature of the phosphatidylcholine-type phospholipid is below that of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine.

* * * * *

NHK Eテレ
2012年7月15日 放映

サイエンス
ZERO



早大グループが「人工赤血球」を開発 大学見本市で発表

掲載日: 2012/10/19 11:39

URL: <http://www.j-cast.com/2012/10/19150124.html>

今年度のノーベル医学生理学賞が山中伸弥・京都大学iPS細胞研究所長に決まり、科学界は沸いている。数個の遺伝子の操作で、どんな細胞にも育ちうる万能のiPS細胞（人工多能性幹細胞、新型万能細胞）は間違いなく近年の日本技術の頂点だが、実はそれに匹敵するような目ざましい技術がないわけではない。

輸血用として長期保存が可能

2012年9月27、28日に東京国際フォーラムで開かれた大学見本市「イノベーション・ジャパン2012」で、早稲田大学重点領域研究機構の酒井宏水・上級研究員グループが発表した人工赤血球の開発がその一つだ。

赤血球は3週間程度しか保存できないが、グループは期限切れの赤血球から主成分のヘモグロビンを精製、脂質膜で包んだ直径250ナノメートル（ナノは10億分の1）のヘモグロビン小胞体に再生する技術確立した。途中で摂氏60度10時間の加熱処理が可能になったため、感染源を排除して長期間保存でき、血液型もない。空気に触れるとすぐに酸素と結合する。輸血用人工血液としては、病院で長期保存できるので、緊急事態や不測の災害にも対応でき、血液型の間違いもなくせる。また、濃厚酸素液として脳梗塞や心筋梗塞直後の治療、臓器保存などの用途も考えられる。脳梗塞治療に有効なことはネズミ実験で確認済み。実験室では数リットル規模の製造法が完成している。

大学見本市は大学の研究者と企業を結びつける場。土田英俊・理工学部教授（故人）らが約20年前に合成に成功して以来、早稲田大学は人工血液研究で世界をリード、すでに実用化段階に達したと見られる。しかし、これまで強い関心を示したのは米国やイスラエルなどの軍関係企業で、血液は日本赤十字社の独占事業になっていて制約の多い日本では、企業の関心は高くない。「厚生労働省など国の研究費が投入された人工血液を日本で生産し、世界中に輸出して役立てたいのだが…」と、グループの研究者は訴えていた。

(医療ジャーナリスト・田辺功)

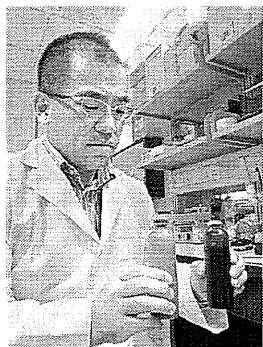
J-CAST モバイル ニュース
<http://www.j-cast.com/m/news.html>

Copyright (c) J-CAST Co.,Ltd. 2004-2012. All rights reserved.

「シンガポールの研究者との共同研究も深まり、両国政府機関の助成金も得られるようになった」。シンガポールの内外の企業や大学の研究所を集めた複合施設「バイオポリス」で11月に開かれた記念シンポジウム。3周年を迎えた早稲田バイオサイエンス・シンガポール研究所(WABIOS)の所長、石渡信一があいさつに立った。

□ ■ □

早稲田バイオサイエンス・シンガポール研



人工赤血球は輸血・献血を補完する役割が期待されている

知の明日を築く

アジア発、生命科学研究

シンガポールの国土は東京23区ほどにすぎず、大規模な自動車や家電工場を誘致する余地はない。とはいえ金融に傾斜するのド・キャンブル、武田薬はリスクがある。そこで重点製造業として位置付けたのが高付加価値の製薬・バイオ産業だ。

2009年設立の同研究所は早稲田大学単独としては初の海外拠点。シンガポールを選んだのは「科学技術研究の国際化を目指す」(科学技術研究庁長官のリム・チュアン・ポー)という国策に共鳴したからだ。

シグナリングだ。研究プロジェクトは3つ。1つ目が「セル(細胞)シグナリング」だ。海中を漂うクラゲが人類の生命科学の発展に貢献する。こんな意外な事実が世間に知られるようになったのは08年のノーベル化学賞がきっかけ。米ボストン大学名誉教授の下村脩が1960年代にオワンクラゲから

注目すれば、正常時と病気の細胞や組織の状態を比較できるわけだ。所長の石渡らは3月、細胞内のわずかな温度変化を測定する「ナノ温度の調達が欠かせない。酒井らは期限切れの赤血球を再生する手法を確立した。加熱処理するた

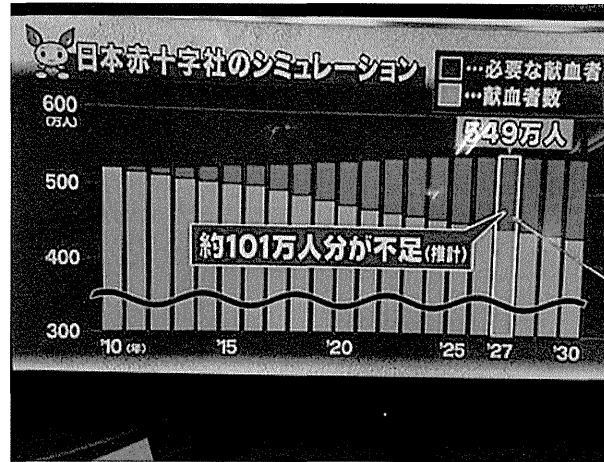


緑色蛍光たんぱく質(GFP)を発見した功績で受賞した。WABIOS主任研究員の北口哲也はこの成果の医療診断や製薬への応用に取り組み。紫外線を当てると緑色の蛍光を発するGFPを目印として他のたんぱく質にくっつけて、がんや神経細胞に

ロジケトだ。「温度計」は中心径が110ナノ(ナノは10億分の1)の蛍光粒子。これを細胞に振りかけることで、細胞内の局所的な温度変化を把握できる。将来は温度を操作すること、細胞の動きを自由に操る可能性がある」と石渡。細胞の分化や集合を操作できれば、再生医療の発展につながる技術になりうる。「実用段階に近づいて」と主任研究員の酒井から。潤沢な資金を持つ医薬のトップ企業が集積する地の利を生かした連携が実現できるか。WABIOSの真価が試される。敬称略(シンガポール) 佐藤大和

電子版に関連記事 ▼WEB刊↓紙面運動

関西テレビ スーパーニュースアンカーで紹介 (2013年5月20日)



世界の血液事情

- ドイツ**
大学病院などがお金を払って採血
(500mlあたり約1300~3640円)
- 中国**
献血をすれば将来の輸血が無料
献血が大学の評価の対象
- ポーランド**
献血で税金免除
(500mlあたり約2000円 所得控除)
延べ18回で公共交通機関が一生無料!



日本テレビ「世界一受けたい授業」で紹介 (2014年7月5日)

ここがスゴい！ 世界に誇るニホンの医療製品！



人工赤血球は一体何から作られているでしょう？



レッツ！ホニャララ ↓



正解は...期限切れの血液

血液の中で一番大事な細胞が赤血球の中にあるヘモグロビン。これを期限切れの血液から特殊な方法で取り出し、

人口の細胞膜の中に移し替えることで、どんな血液型でも合う長期保存可能な人口赤血球を作り出すことに成功したのです。

しかも通常の赤血球と比べると、大きさは30分の1と細かいので、流れもスムーズ！なので、脳梗塞など、毛細血管が細くなる病気が発症した場合にも、効果が期待できます。

The 20th Annual Symposium of the Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会 第20回 年次大会

会 期：平成25年12月6日(金)・7日(土)

会 場：奈良県新公会堂 (奈良市春日野町101)

大会長：酒井 宏水 (奈良県立医科大学 化学教室 教授)

「二十年の節目を迎え
血液代替物研究の更なる発展を期待して」

シンポジウム1 「人工赤血球(Hb小胞体)製剤の将来展望」

シンポジウム2 「人工血小板/H12-(ADP)リボソームの前臨床」

特別講演1 「わが国の血友病止血治療薬の歴史と展望」

(奈良県立医科大学 学長・吉岡 章 先生)

特別講演2 「重症マラリアの合併症とその治療」

(国立国際医療研究センター研究所 部長・狩野 繁之 先生)

教育講演 「クモの糸のミステリー」

(奈良県立医科大学・大崎 茂芳 先生)

トピックス1 「TPAを内包するナノパーティクルを用いた、急性心筋梗塞症に対する
次世代血栓溶解療法の開発」

(奈良県立医科大学内科学 教授・斎藤 能彦 先生)

トピックス2 「妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた新しい治療法の開発」

(国立精神神経医療研究センター 室長・太田 英伸 先生)

一般演題: 計10件

《事務局》奈良県立医科大学 化学教室

〒634-8521 奈良県橿原市四条町840

TEL & Fax: 0744-29-8810

E-mail: artificial-blood@naramed-u.ac.jp

http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/20th_SBSJ.html

第20回日本血液代替物学会年次大会

The 20th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

「二十年の節目を迎え 血液代替物研究の更なる発展を期待して」

大会長：酒井宏水（奈良県立医科大学医学部 化学教室・教授）

会 期：平成25年12月6日（金）、7日（土）

会 場：奈良県新公会堂（奈良県奈良市春日野町101）

【年次大会事務局】

奈良県立医科大学 医学部 化学教室内
〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840
Tel & Fax : 0744-29-8810
e-mail : artificial-blood@naramed-u.ac.jp

大会長挨拶

さてこの度、奈良県立医科大学化学教室の主催で日本血液代替物学会の第20回年次大会を開催させて頂くことになりました。年次大会は、「血液型に関係なく、安全で、長期備蓄できる、血液成分の代替物を開発し医療に貢献する事」を目指す、理工学、薬学、医学関連の産官学の研究者・医師が年に一度集い、研究の進展状況や、新しい技術などに関して、情報交換を行う貴重な場となっています。

わが国における血液代替物研究には、世界的にみても独創性の高い物質系を次々と生み出してきた半世紀以上におよぶ輝かしい歴史があります。これは、血液代替物の必要性が極めて明瞭で、患者にとってその実現は福音であり、また周辺医療技術への波及効果が絶大であることは容易に想像ができ、多くの研究者、医師を惹き付けてきた研究テーマであること物語っております。血漿成分については、遺伝子組換え技術も導入され、代用血漿剤や凝固因子など先進的な物質が実用化されています。しかし赤血球と血小板の代替物については今日、未だに実用化されていない状況です。わが国で近年開発研究が進展している人工赤血球、人工血小板は、アカデミアを中心とした研究組織によりその効能と安全性が多角的に検討され、膨大な非臨床データが蓄積されて参りました。長期間の備蓄が可能で、血液型に関係なく、感染を心配せずに何時でも必要な時に投与できる血液代替物の開発は、実用化に向け次の段階に進むべき状況にあります。

日本血液代替物学会は1993年7月21日に設立され、翌1994年に第1回目の年次大会が東京で開催されました。今回は第20回目の節目の大会であり、若輩の私が「奈良」で開催する機会を頂きましたことは誠に光栄でございます。学会の設立とこれまでの運営に御尽力くださいました、土田 英俊 先生、関口 定美 先生、小林 紘一 先生、池田 康夫 先生をはじめ、多くの先生方に心より敬意を表し、本学会の進展を振り返りつつ、今後本研究分野の新たな展開が続くことを念じ、テーマを「二十年の節目を迎え 血液代替物研究の更なる発展を期待して」としました。有意義で大きな成果を上げるよう学会関係者一同、鋭意努力致していく所存です。皆様のご参加により活発な御議論を頂き、本大会が、わが国で開発されて来た血液代替物の実用化への後押しとなること、また業界側に対するアピールが出来る機会になることを願っております。

なお、本年次大会の運営にあたり、ご寄附下さいました業界各社の御担当の皆様に対し、心より御礼申し上げます。これを機に、血液代替物研究へのご関心を益々深めて頂きますとともに、引続きのご支援と、開発研究に対する積極的なご関与を期待しております。どうぞ宜しく御願い致します。

第20回日本血液代替物学会年次大会
大会長 酒井宏水
奈良県立医科大学医学部化学教室 教授

日本血液代替物学会 20 年のあゆみ

会 合 名	会 期	大 会 長	会 場
日本血液代替物学会 設立	1993.7.21		明治記念館 (東京)
血液代替物 シンポジウム	1993.12.3-4		フォーシーズンズホテル (東京)
第 1 回年次大会	1994.6.16-17	小林 紘一 (慶應義塾大学医学部)	ホテルオークラ (東京)
第 2 回年次大会	1995.6.19-20	阿岸 鉄三 (東京女子医科大学)	フォーシーズンズホテル (東京)
第 3 回年次大会	1996.6.18-19	元木 良一 (福島県立医科大学)	福島ビューホテル (福島)
第 4 回年次大会 第 7 回血液代替物 国際会議 (7-ISBS)	1997.9.7-10	土田 英俊 (早稲田大学理工学部)	早稲田大学国際会議場 (東京)
第 5 回年次大会	1998.9.4-5	関口 定美 (北海道赤十字血液センター)	かでの 2・7 (札幌)
第 6 回年次大会	1999.9.10-11	池田 康夫 (慶應義塾大学医学部)	京王プラザホテル (東京)
第 7 回年次大会	2000.9.7-8	北島 顕 (北海道大学医学部)	かでの 2・7 (札幌)
第 8 回年次大会	2001.9.4-5	清水 勝 (東京女子医科大学)	シェーンバッハ・サボー (東京)
第 9 回年次大会	2002.9.4-5	西 勝英 (熊本大学医学部)	熊本国際交流会館 (熊本)
第10回年次大会 第 9 回血液代替物 国際会議 (9-ISBS)	2003.3.3-5	小林 紘一 (慶應義塾大学医学部)	京王プラザホテル (東京)
第11回年次大会	2004.7.13-14	川村 明夫 (札幌北榆病院)	北方圏センター (札幌)
第12回年次大会	2005.6.6-7	武岡 真司 (早稲田大学理工学部)	早稲田大学国際会議場 (東京)
第13回年次大会	2006.8.24-25	末松 誠 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学信濃町キャンパス (東京)
第14回年次大会	2007.6.14-15	半田 誠 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学三田キャンパス (東京)
第15回年次大会	2008.10.23	堀之内 宏久 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学信濃町キャンパス (東京)
第16回年次大会	2009.10.16-17	高折 益彦 (東宝塚さとう病院)	慶應義塾大学信濃町キャンパス (東京)
第17回年次大会	2010.10.18-19	小田切 優樹 (熊本大学薬学部)	熊本国際交流会館 (熊本)
第18回年次大会	2011.10.27-28	米川 元樹 (札幌北榆病院)	北海道大学医学部学友会館フラテ (札幌)
第19回年次大会	2012.10.25-26	東 寛 (旭川医科大学)	旭川大雪クリスタルホール (旭川)
第20回年次大会	2013.12.6-7	酒井 宏水 (奈良県立医科大学)	奈良県新公会堂 (奈良)

大会日程表

	平成 25 年 12 月 6 日 (金)	平成 25 年 12 月 7 日 (土)
9:00	9:00-9:25 受付 9:25 開会の辞	9:00-9:30 受付
9:30	9:30 第20回年次大会を祝して	9:30-11:00 一般演題 2 司会：小松 晃之 (中央大学) 佐藤 高彰 (信州大学)
10:00	9:40-10:30 特別講演 1 「わが国の血友病止血治療薬の歴史と展望」 演者：吉岡 章 (奈良県立医科大学 学長) 司会：池田 康夫 (早稲田大学)	演者：木村 拓矢 (中央大学) 春木 理沙 (中央大学) 伊藤 大知 (東京大学) 佐藤 高彰 (信州大学) 赤羽 健 (信州大学) 百武 徹 (横浜国立大学)
10:30	10:30-11:30 一般演題 1 司会：堀之内 宏久 (さいたま市立病院) 演者：東 寛 (旭川医科大学)	
11:00	丸山 徹 (熊本大学) 高瀬 凡平 (防衛医科大学校) 垣内 健太 (早稲田大学)	11:00-11:10 休憩
11:30	11:30-12:20 理事会	11:10-12:00 特別講演 2 「重症マラリアの合併症とその治療」 演者：狩野 繁之 (国立国際医療研究センター 部長) 司会：酒井 宏水 (奈良県立医科大学)
12:00		12:00-12:05 休憩
12:30	12:20-12:50 評議員会 12:50-13:00 休憩	12:05-12:55 教育講演 (ランチョンセミナー) 「クモの糸のミステリー」 演者：大崎 茂芳 (奈良県立医科大学 名誉教授) 司会：山本 恵三 (奈良県立医科大学)
13:00	13:00-13:30 総会	12:55-13:00 休憩
13:30	13:30-16:00 シンポジウム 1 「人工赤血球(Hb 小胞体)製剤の将来展望」 司会：小林 紘一 (慶應義塾大学) 高折 益彦 (東宝塚さとう病院)	13:00-15:30 シンポジウム 2 「人工血小板/H12-(ADP)リボソームの前臨床」 司会：武岡 真司 (早稲田大学) 丸山 徹 (熊本大学)
14:00	演者：河野 光智 (慶應義塾大学) 東 寛 (旭川医科大学)	演者：岡村 陽介 (東海大学) 藤山 敦史 (早稲田大学) 土井 麻実 (早稲田大学) 橋本 麻衣 (熊本大学薬学部) 萩沢 康介 (防衛医科大学校)
14:30	田口 和明 (崇城大学) 力久 直昭 (千葉労災病院) 荒木 淳 (東京大学附属病院)	
15:00		
15:30		15:30-15:40 休憩
16:00	16:00-16:10 休憩 16:10-17:00 トピックス 1 「TPA を内包するナノパーティクルを用いた、急性心筋梗塞症に対する次世代血栓溶解療法の開発」 演者：斎藤 能彦 (奈良県立医科大学 教授) 司会：武岡 真司 (早稲田大学)	15:40-16:30 トピックス 2 「妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた新しい治療法の開発」 演者：太田 英伸 (国立精神神経医療研究センター 室長) 司会：木下 学 (防衛医科大学校)
16:30		16:30 閉会の辞
17:00		
17:30	17:30- 懇親会 (1 階, 奈良迎賓館)	
18:00		

第1日目 平成25年12月6日(金)

9:25 開会の辞

9:30-9:40 第20回年次大会を祝して

9:40-10:30 特別講演1

「わが国の血友病止血治療薬の歴史と展望」

演者：吉岡 章（奈良県立医科大学・学長）

司会：池田 康夫（早稲田大学）

10:30-11:30 一般演題1

司会：堀之内 宏久（さいたま市立病院）

1. 「リポソームの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」
東 寛（旭川医科大学）
2. 「出血性ショック輸血後の肝障害に対する一酸化炭素付加赤血球の保護メカニズム」
丸山 徹（熊本大学）
3. 「出血性ショック心臓における致死性不整脈発生機序及び人工酸素運搬体による治療効果に関する検討」
高瀬 凡平（防衛医科大学校）
4. 「マイクロ・ナノバブル分散酸素富化液を用いた液体換気への応用」
垣内 健太（早稲田大学）

11:30-12:20 理事会（小会議室3）

12:20-12:50 評議員会（小会議室3）

12:50-13:00 休憩

13:00-13:30 総会（学会会場：会議室3-4）

13:30-16:00 シンポジウム1「人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の将来展望」

司会1：小林 紘一（慶應義塾大学），司会2：高折 益彦（東宝塚さとう病院）

1. 「肺切除術後出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与と HIF-1 alpha の発現について」
河野 光智（慶應義塾大学医学部）
2. 「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」
東 寛（旭川医科大学）
3. 「一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の特発性肺線維症治療薬としての創製」
田口 和明（崇城大学薬学部）
4. 「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」
力久 直昭（千葉労災病院形成外科）
5. 「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」
荒木 淳（東京大学附属病院）

16:00-16:10 休憩

16:10-17:00 トピックス1

「TPA を内包するナノパーティクルを用いた、急性心筋梗塞症に対する次世代血栓溶解療法の開発」

演者：斎藤 能彦（奈良県立医科大学内科学・教授）

司会：武岡 真司（早稲田大学）

17:30-20:00 懇親会（奈良県新公会堂内，クイーンアリス 奈良迎賓館）

第2日目 平成25年12月7日(土)

9:30-11:00 一般演題2

司会1:小松 晃之(中央大学), 司会2:佐藤 高彰(信州大学)

1. 「ヒト(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成と酸素結合能制御」
木村 拓矢(中央大学)
2. 「(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの溶液物性と血液適合性」
春木 理沙(中央大学)
3. 「SPG膜乳化法を用いたヘモグロビン/アルブミン架橋型人工酸素運搬体の開発」
伊藤 大知(東京大学)
4. 「ヘモグロビン小胞体(HbV)の静的構造及び濃厚ヘモグロビン溶液中の蛋白質相互作用」
佐藤 高彰(信州大学)
5. 「水和ポリエチレングリコールの排除体積効果と分子機能:ミセル系とポリエチレングリコールを包摂した蛋白質系の比較検討」
赤羽 健(信州大学)
6. 「微小血管における人工赤血球の酸素運搬過程に関する数値解析」
百武 徹(横浜国立大学)

11:00-11:10 休憩

11:10-12:00 特別講演2

「重症マラリアの合併症とその治療」

演者:狩野 繁之(国立国際医療研究センター 研究所 部長)

司会:酒井 宏水(奈良県立医科大学)

12:00-12:05 休憩

12:05-12:55 教育講演(ランチョンセミナー)

「クモの糸のミステリー」

演者:大崎 茂芳(奈良県立医科大学・名誉教授)

司会:山本 惠三(奈良県立医科大学)

12:55-13:00 休憩

13:00-15:30 シンポジウム2「人工血小板/H12-(ADP)リポソームの前臨床」

司会1:武岡 真司(早稲田大学), 司会2:丸山 徹(熊本大学)

1. 「人工血小板:H12-(ADP)リポソームの設計」
岡村 陽介(東海大学)
2. 「人工血小板の品質評価に関する検討」
藤山 敦史(早稲田大学)
3. 「人工血小板H12-(ADP)リポソームの止血能評価(出血後投与による検討)」
土井 麻実(早稲田大学)
4. 「健常及び病態時における血小板代替物H12(ADP)リポソームの頻回投与が体内動態に及ぼす影響」
橋本 麻衣(熊本大学)
5. 「H12-ADP-liposomeの新たな適応:衝撃波による肺出血マウスに対するH12-ADP-liposomeの救命効果」
萩沢 康介(防衛医大)

15:30-15:40 休憩

15:40-16:30 トピックス2

「妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた新しい治療法の開発」

演者:太田 英伸(国立精神神経医療研究センター・室長)

司会:木下 学(防衛医科大学校)

16:30 閉会の辞

シンポジウム 10 TTP と HUS (総会長シンポジウム)

(共催:アレクシオン ファーマ)

5月16日(金) 15:30~17:30 第4会場(奈良県新公会堂 1F 能楽ホール)

座長:藤村 吉博(奈良県立医科大学輸血部)
森岡 正信(愛育病院血液内科)

- S-10-1 TTP/HUS の遺伝子解析
宮田敏行
(国立循環器病研究センター分子病態部)
- S-10-2 TTP の診断と治療
松本雅則
(奈良県立医科大学輸血部)
- S-10-3 STEC-HUS の診断と治療
上田恭典^{1,2)}
(公益財団法人大原記念倉敷中央医療機構倉敷中央病院血液内科¹⁾,
公益財団法人大原記念倉敷中央医療機構倉敷中央病院血液治療センター²⁾)
- S-10-4 aHUS の診断
吉田瑠子
(奈良県立医科大学輸血部)
- S-10-5 aHUS の治療
芦田 明, 玉井 浩
(大阪医科大学泌尿生殖・発達医学講座小児科)

シンポジウム 11 輸血後鉄過剰症のマネジメント

(共催:ノバルティス ファーマ株式会社)

5月16日(金) 10:00~11:30 第6会場(奈良県新公会堂 2F レセプションホール)

座長:藤井 康彦(山口大学医学部附属病院輸血部)
芦田 隆司(近畿大学医学部血液・膠原病内科/近畿大学医学部附属病院輸血・細胞治療センター)

- S-11-1 輸血後鉄過剰症の病態と治療
鈴木隆浩
(自治医科大学医学部内科学講座血液学部門)
- S-11-2 輸血後鉄過剰症のマネジメント~具体的な取り組み事例~医師の立場から~
末岡榮三朗
(佐賀大学医学部臨床検査医学講座)
- S-11-3 輸血後鉄過剰症に対する輸血部の役割
井上まどか, 山岡 学, 山本茉美, 寺嶋由香利, 阿部 操, 大西修司, 石井一慶, 野村昌作
(関西医科大学附属枚方病院輸血・細胞療法部)
- S-11-4 臨床輸血看護師による輸血後鉄過剰症に対する患者教育への取り組み
松本真弓
(神鋼病院看護部)

シンポジウム 12 輸血治療を補完する人工赤血球製剤の効力と安全性

5月17日(土) 10:00~12:00 第4会場(奈良県新公会堂 1F 能楽ホール)

座長:酒井 宏水(奈良県立医科大学医学部化学教室)
高折 益彦(川崎医科大学名誉教授)

- S-12-1 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の開発状況
酒井宏水
(奈良県立医科大学化学教室)

- S-12-2 人工赤血球製剤の血液学的, 免疫学的安全性
東 寛¹⁾, 藤原満博²⁾, 酒井宏水³⁾
(旭川医科大学¹⁾, 北海道ブロック血液センター²⁾, 奈良県立医科大学³⁾)
- S-12-3 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
小田切優樹¹⁾, 田口和明¹⁾, 丸山 徹²⁾, 酒井宏水³⁾, 小林紘一⁴⁾
(崇城大学薬学部¹⁾, 熊本大学薬学部²⁾, 奈良県立医科大学³⁾, 慶應義塾大学医学部⁴⁾)
- S-12-4 人工赤血球製剤による救命救急の可能性
木下 学¹⁾, 高瀬凡平²⁾, 田中良弘³⁾, 西川可穂子³⁾, 萩沢康介⁴⁾, 柳川隼平⁵⁾, 斎藤大蔵⁶⁾, 酒井宏水⁷⁾,
関 修司¹⁾
(防衛医科大学校免疫微生物¹⁾, 防衛医科大学校集中治療部²⁾, 防衛医科大学校救急部³⁾,
防衛医科大学校生理学⁴⁾, 防衛医科大学校防衛医学⁵⁾, 防衛医学研究センター外傷研究部門⁶⁾,
奈良県立医科大学化学⁷⁾)
- S-12-5 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
堀之内宏久¹⁾, 酒井宏水²⁾, 泉 陽太郎³⁾, 饗庭 了⁴⁾, 勢司泰久⁴⁾, 小林紘一⁴⁾
(さいたま市立病院呼吸器外科¹⁾, 奈良県立医科大学化学教室²⁾,
埼玉医科大学総合医療センター呼吸器外科³⁾, 慶應義塾大学医学部⁴⁾)

シンポジウム 13 学会認定・自己血輸血医師看護師制度の課題—認定取得看護師はどこまで責任を負えるか—
(第 25 回学会認定・自己血輸血医師看護師制度協議会指定セミナー)

(共催: 協和発酵キリン株式会社/川澄化学工業株式会社/ヘモネティクスジャパン合同会社)

5月17日(土) 9:30~11:00 第5会場(奈良県新公会堂 1F 会議室1+2)

座長: 脇本 信博(帝京大学医学部附属病院整形外科)

面川 進(秋田県赤十字血液センター)

- S-13-1 基調報告—学会認定・自己血輸血医師看護師制度の課題と今後の展開
脇本信博
(帝京大学医学部附属病院整形外科)
- S-13-2 看護師の立場から—当院における貯血式自己血採血の現状
足立栄子
(社会福祉法人函館厚生院函館五稜郭病院看護部)
- S-13-3 看護師の立場から—当院の自己血貯血時体制について
村田真由美, 石田涼子, 上田恭典
(倉敷中央病院血液治療センター)
- S-13-4 医師の立場から—貯血式自己血輸血における貯血時の安全性確保への取り組み
中村文彦
(天理よろづ相談所病院臨床検査部)
- S-13-5 医師の立場から—中電病院における自己血輸血の現状
高橋和寛
(中国電力(株)中電病院整形外科)

シンポジウム 14 輸血医療における看護師の役割

5月17日(土) 11:00~12:30 第5会場(奈良県新公会堂 1F 会議室1+2)

座長: 田崎 哲典(東京慈恵会医科大学附属病院輸血部)

梶原 道子(国立大学法人東京医科歯科大学医学部附属病院輸血部)

- S-14-1 市中病院における臨床輸血看護師の役割
大西まり, 森尾志保
(伊勢赤十字病院看護部)

シンポジウム 12 輸血治療を補完する人工赤血球製剤の効力と安全性

S-12-1 人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の開発状況

奈良県立医科大学化学教室
酒井宏水

輸血代替の創製を目的として開発されて来た人工赤血球 (Hb 小胞体) 製剤は、血液と同等の酸素運搬機能をもつ濃厚な微粒子分散液である [平均粒子径: 250 nm, [Hb] = 10g/dL, 粒子占有体積 (Hct に相当): 40% 程度; 酸素親和度 (P_{50}) = 25-28 torr]。日本赤十字社から研究用として譲渡を受けた非使用赤血球 (期限切れ) をもとに、加熱処理とナノフィルトレーションを経て高純度・高濃度 Hb を調製し、リン脂質小胞体内に封入する。この時点で「ナマモノ」から「物質」に変換されたといえる。Hb 小胞体は、赤血球と類似のカプセル構造により NO 捕捉など Hb の副作用を遮断する。我々は厚生労働科学研究として本製剤の製造法を確立するとともに、非臨床試験により有効性と安全性について検討して来た。出血性ショック蘇生液として、また体外循環回路補填液としての有効性などを明らかにするとともに、製剤の特性 (小粒子径、酸素親和度の調整、比較的高い粘性、CO 結合性) を活かし、輸血では対応の出来ない疾患や治療など、新しい臨床応用の可能性も実証してきた。他方、人工赤血球製剤の安全性については、投与量が一人当たり数リットル以上になることも想定されるので、生体に対する影響を注意深く検討してきた。本シンポジウムでは、人工赤血球の微粒子分散液にどのような性質があるのか、また、これまでに明らかになった輸血代替としての効力と安全性について理解を深めていきたい。

S-12-2 人工赤血球製剤の血液学的、免疫学的安全性

旭川医科大学¹⁾、北海道ブロック血液センター²⁾、奈良県立医科大学³⁾
東 寛¹⁾、藤原満博²⁾、酒井宏水³⁾
TEL: 0166-68-2481 FAX: 0166-68-2489 E-mail: azuma5p@asahikawa-med.ac.jp

我が国の人工酸素運搬体は、脂質二分子膜 (リポソーム) にヒトヘモグロビンを内包した、いわゆる細胞型人工赤血球で、Hemoglobin vesicle (HbV) と呼称されている。その酸素運搬能は、ヒト赤血球のそれと遜色がない。実際に脱血モデル動物を用いた実験では血液代替物として安全に使用できることが示されている。その血液代替物としての使用を考えると、通常のリポソーム製剤での投与量を遥かに越える量のリポソームを投与することになり、予期せぬ副作用の発症が懸念される。その為に、開発に際して、大量投与に伴う有害事象が様々な角度から検討されてきた。我々は、HbV のヒトあるいはラットの血液成分に与える影響を *ex vivo* あるいは *in vivo* で検討してきた。即ち、HbV が血小板、好中球、補体系等と直接接触することによりいかなる影響を受けるかについて検討を行なった。生命に危険を及ぼすと考えられる重大な副作用や、軽微であっても長期に持続する無視できない副作用は観察されず、結果として、そのすぐれた生体適合性を実証してきた。また、投与された HbV は細網内皮系に速やかに取り込まれることが示されている。そのことが免疫応答に与える影響についても、詳細な検討が行われている。その結果 1) HbV を投与後に採取したラットの脾細胞では特異的および非特異的刺激に対する T 細胞増殖反応が一過性に抑制される。2) しかし、その抑制は HbV 投与後 1 週間完全に解除される。3) この抑制には一酸化窒素が関与している。4) HbV の投与によっても外来抗原に対する生体の抗体産生反応は抑制されない、ことを明らかにした。これらの結果から、HbV を投与することにより、一過性に T 細胞増殖能に影響がでる可能性はあるものの、重篤な免疫不全状態が長期わたり持続する可能性は極めて少ないと判断される。本シンポジウムでは、以上の諸々の知見についての実際のデータを紹介し、HbV の安全性について再考する。