

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

(研究課題番号：H24-創薬総合-一般-009)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 酒井 宏水

(奈良県立医科大学)

平成 26 (2014) 年 5 月

目次

総括研究報告書	1
酒井 宏水（奈良県立医科大学 医学部 化学教室 教授）	
分担研究報告書	
1. 酒井 宏水（奈良県立医科大学 医学部 化学教室 教授）	9
2. 小田切 優樹（崇城大学 薬学部 教授）	39
3. 東 寛（旭川医科大学 医学部 教授）	49
4. 高瀬 凡平（防衛医科大学校付属病院 集中治療部 准教授（臨床教育教授））	57
研究成果の刊行に関する一覧表	65
研究成果の刊行物・別冊	67

総括研究報告書

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

研究代表者 酒井 宏水 奈良県立医科大学医学部 教授

研究要旨

日本の献血-輸血システムの安全性は世界最高水準にあり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし感染の可能性、過誤による血液型不一致、保存期限が3週間と短く災害や有事の危機管理体制に不安を残している。また、少子高齢化により血液の需給バランスが崩れつつある。人工赤血球は、これらの問題を改善する製剤としてその実現が期待されている。赤十字血液センターで発生する期限切れ赤血球は、諸工程を経て、感染源を含まず、血液型が無く、長期保存に耐える人工赤血球製剤に「再生」される。輸血の代替のみならず、輸血では対応の出来ない疾患や外科的処置への利用、Unmet Medical Needsへの対応も期待されている。本研究は国策として推進され、製造法や脂質膜構成成分の改良を繰返し、投与実験の結果をフィードバックさせ現行の製剤を確立した。動物試験で得られた安全性と有効性に関する膨大な知見を基に、臨床応用を目指す段階にある。本研究では、日本発の革新的医薬品として人工赤血球(Hb小胞体, HbV)の早期実現を目指し、製剤開発者、臨床医、薬理担当者、PMDA審査経験者が共同し、原料製造や製剤化に関わる企業との連携のもと、次の項目について検討し、臨床応用を目指している。平成25年度の成果は以下の通り。

(1) Hb小胞体の製造において、混練法を用いるHb溶液の内包プロセスについて継続して検討している。本年度は奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設置し、定常的に試験製造できる状態になった。脂質量40g, 高純度高濃度Hb溶液140 mLをもとに、10分程度の混練操作で約300-400mLのHb小胞体を製造出来る条件を見出すことができた。(2) Hb小胞体について、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なった。突然変異は認められず、Hb小胞体の安全性が確認された。(3) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程として、プロピロラクトン(BPL)の添加が有効であることを確認している。今年度は芽胞の不活化させるため、芽胞を発芽させてBPLを添加する方法を検討したが、効果は限定的であった。(4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なった。全例が生存し、食餌量、運動量の回復も比較の赤血球投与と同等であり、アルブミン投与とは対照的であった。また、臓器のHIF-1 発現量も低いことから、出血時にHb小胞体を投与して組織が酸素化されている事が重要と考えられた。(5) 毛細管内に分散する人工赤血球は、色素レーザー照射法におけるターゲットになりうる。鶏冠を血管腫モデルとして用い、人工赤血球を投与してレーザー照射したところ、標的部位に強い炎症反応を生起することが解り、レーザー治療への応用の可能性が明らかになった。(6) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を行った。保存中の血液ガス組成から組織は酸素代謝を維持しており、これにより8時間の保存後の再接合術が可能であることを確認した。(7) 高脂血症

モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与した。健常動物と同様にHb小胞体の大部分は肝臓・脾臓に分布したが、投与後14日目には約5%の放射活性が肝臓において確認されたものの、その他の臓器では消失していた。血漿中に約3%の放射活性が確認されたが、これはHb小胞体の脂質膜が代謝・排泄される過程においてHDL-コレステロールなどに取り込まれた³Hが検出されていると推測された。生活習慣病である高脂血症時におけるHb小胞体の安全性(生体蓄積性)を体内動態学的観点より初めて明らかにした。(8)一酸化炭素(CO)を結合させたHb小胞体の特発性肺線維症(IPF)モデルマウスに投与した。肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認され、IPFの新規治療薬としての可能性が見出された。(9)ラットに投与後、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。本年度はT細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。産生が増加するものとして、主としてマクロファージが産生する、CC-chemokine, IL-10, TNF- α およびTh1サイトカインであるIFN- γ , IL-2が明らかになった。産生誘導が認められないものとしてIL-1 β , IL-18, Th2 cytokineであるIL-4, 5, 13が明らかになった。また、リポソームを貪食したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをコントロールマクロファージと比較し、貪食後に発現の増強を認める遺伝子群を同定した。(10)出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。ラット出血性ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミンによる蘇生を行なったところ、著明な左心室伝導遅延と興奮伝播・活動電位持続時間不均一性の増大及び心筋組織のconnexin 43発現異常を惹起し、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。赤血球治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。このモデルは、Hb小胞体の有効性を評価するのに適したものと考えられ、次年度に継続して検討する予定である。

研究分担者

小田切優樹 崇城大学薬学部 教授
東 寛 旭川医科大学医学部 教授
高瀬 凡平 防衛医科大学校 准教授

岩本美智子 医療法人川村病院 医師
力久 直昭 千葉労災病院 医師

研究協力者

小林 紘一 慶應義塾大学医学部 名誉教授
高折 益彦 川崎医科大学 名誉教授
堀之内宏久 さいたま市立病院 部長
(慶應義塾大学医学部 客員講師)
河野 光智 慶應義塾大学医学部 講師
木下 学 防衛医科大学校 准教授
荒木 淳 東京大学附属病院形成外科 医師

A. 研究目的

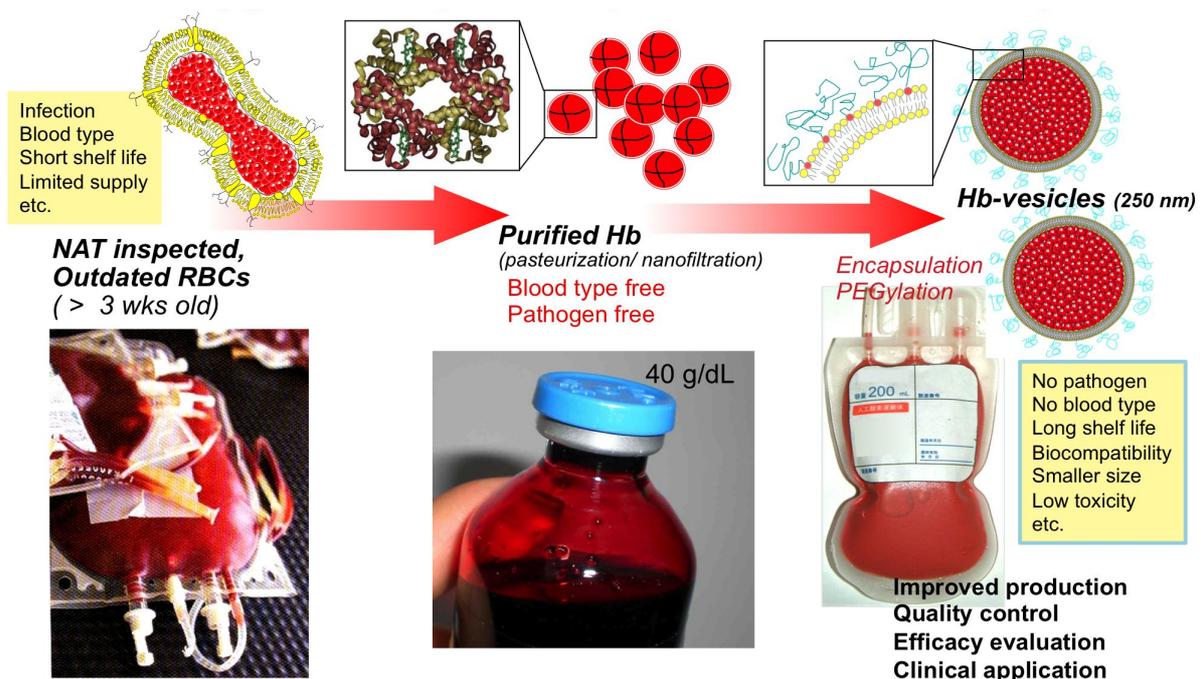
日本の献血-輸血システムの安全性は世界最高水準にあり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、感染の可能性、過誤による血液型不一致、保存期限が3週間と短く災害や有事の危機管理体制に不安を残している。また、少子高齢化により血液の需給バランスが崩れつつある。人工赤血球(Hb小胞体:HbV)は、これらの問題を改善する新しい製剤としてその実現が期待されている。本研究は、期限切れ血液に最も多く含まれるHbの有効利用の観点から政策的に始まった[1]。期

限切れ赤血球は諸工程を経て、感染源を含まず、血液型が無く、長期保存に耐え、輸血治療を「補完」する人工赤血球製剤に「再生」される[2]。また、輸血では対応の出来ない疾患や外科的処置、Unmet Medical Needsへの対応も期待している。本研究は、日本発の革新的医薬品として人工赤血球の早期実用化を目指すことを目的としている。

HbVの研究は厚生労働科学研究として1997年より推進され、Hb精製、Hbの内包、脂質膜の構成成分の改良、投与実験により有効性と安全性を検討し、結果をフィードバックさせ現行の製剤を確立した[1,2]。病態モデル(出血性ショック[3]、体外循環[4]、皮弁創傷治癒[5]、担がん[6]など)で有効性を実証、体内動態[7]や凝固系・免疫系[8]への影響も精査した。このように本製剤は実用化を目指す段階にあり、当該研究をH24年度より3年間の研究として開始した。昨年度(H24年度)の進捗状況として、まず製造法について、未解決課題の検討を急ぎ、混錬法によるHb内包効率の向上[9]と無菌試験法を確立した。輸血代替としての安全性は、まずカニクイザル大量投与後の一般毒性・血中半減期を明らかにした[10]。RES捕捉に関する先見的な研究として、ラット出血性ショック蘇生後の体内動態を

検討、また脾T細胞の一過性増殖抑制について投与量との相関やiNOSの寄与を解明した。リポソームを捕捉した細胞の遺伝子発現プロファイルを検討し、制御に關与する候補分子の絞り込みを行っている。臓器灌流保存液としての利用について、ラット切断下肢および摘出肺を用いて検討中である。

本研究では、Hb小胞体制剤の臨床応用の早期実現を目指している。これまでの結果を受けて、H25年度は継続して、(1)従来のHb小胞体の製造において、混錬法を用いるHb溶液の内包プロセスについて継続して検討する。そのため、研究代表者の異動に伴い、奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設置し、定常的に試験製造で切る体制を早急に構築する。(2) Hb小胞体には、合成脂質(DHSG)が含まれること、またHbO₂の自動酸化の過程でごく僅かではあるが活性酸素種を産生するので、安全性項目として、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なう。(3) -プロピロラクトン(BPL)の添加による滅菌法について、芽胞を発芽させてからBPLを添加する方法を検討する。(4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb



小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なうとともに、組織への酸素供給について検討する。(5)毛細管内に分散する人工赤血球を、色素レーザー照射法におけるターゲットとして利用することを目指し、鶏冠を血管腫モデルとして用いる実験を行なう。(6)ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を継続する。(7)高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与し、体内動態を検討する。(8)一酸化炭素を結合させたHb小胞体を特発性肺線維症(IPF)モデルマウスに投与し、その効果を検討する。(9)ラットに人工赤血球を投与した後の脾細胞は、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。これに関連し、T細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定する。(10)出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。ラット出血性ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミン、赤血球による蘇生を行い、酸素運搬の必要性を明らかにし、人工赤血球評価法として確立する。以上を目的とする。

欧米で先行した修飾Hb溶液系は、内因性NOを急激に捕捉するため、血管収縮や心筋毒性などの副作用が確認され[11]、米国NIH-Workshop(2008)でも議論された。対してHb小胞体はこの副作用を脂質膜で遮蔽でき[12]、第13回国際血液代替物学会(Boston, July 2011)、第14回国際血液代替物学会(Chengdu, China)でも注目された。我が国独自の技術を早期に実現させ、世界をリードする必要がある。

【文献】 [1] 酒井, 土田. *ファルマシア* 2009;45:23-8. [2] Sakai et al., *J Intern Med* 2008;263:4-15, Sakai et al., *Methods Enzymol* 2009;465:363-84. [3] Sakai et al.,

Crit Care Med 2004;32:539-45, Sakai et al., *Shock* 2009;31:192-200. [4] Yamazaki et al., *Circulation* 2006;114:I220-5. [5] Plock et al., *Crit Care Med* 2007;35:899-905, Plock et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H905-10. [6] Yamamoto et al., *J Surg Res* 2009;151:48-54. [7] Taguchi et al., *J Control Release* 2009;136:232-9, Taguchi et al., *Drug Metab Dispos* 2009;37:1456-63. [8] Takahashi et al., *J Pharmacol Exp Ther* 2011;337:42-9. [9] PCT/JP2012/59233:小胞体の製造法. [10] Taguchi et al., *J Drug Metab Toxicol.* 2012;3:1000128. [11] Natanson et al., *JAMA* 2008;299:2304-12. [12] Sakai et al., *J Biol Chem* 2008;283:1508-17, Sakai et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H956-65.

B. 研究方法

(1) Hb小胞体の製造において、混錬法を用いるHb溶液の内包プロセスについて継続して検討した。複合脂質として1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC)、cholesterol, 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-glutamate (DHSG)、ならびに1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-Poly(oxyethylene)₅₀₀₀ (DSPE-PEG5000, PEG鎖の分子量5000)がモル比で5/4/0.9/0.03となるように混合された脂質に対し、高純度ヒトHb溶液(一酸化炭素結合-HbCO体、42 g/dL、0.4 dL、pH7.4)を添加した。そして、混錬装置にて処理を行なった。脱一酸化炭素工程、脱酸素化工程にもH24年度に確立した方法を採用した。奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設置し、定常的に試験製造できる体制を構築した。(2) Hb小胞体の遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium*のTA100, TA98, TA98, TA1535及びTA1537,並びに*Escherichia coli*のWP2uvrAを用い、プレインキュベーションによる復帰突然変異試験を実施した。(3) -プロピロラクトン(BPL)の添加による滅菌法について、芽胞*Bacillus subtilis* spores ATCCを添加し、これを加温インキュベートして発芽させてからBPLを添

加する方法を検討した。(4)片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なうとともに、組織への酸素供給についてHIF-1の免疫染色を行なった。(5)毛細管内に分散する人工赤血球を、色素レーザー照射法におけるターゲットとして利用することを旨とし、鶏にHb小胞体を投与し、鶏冠を血管腫モデルとして利用し、レーザーを照射し、照射部位について組織病理学的に検討した。(6)ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を継続した。ラット切断下肢を8時間、Hb小胞体で灌流したあと、再接着し100日間観察をした。(7)高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスに³H放射化ラベルしたHb小胞体を単回大量投与し、体内動態を検討した。(8)特発性肺線維症(IPF)モデルマウスを、ブレオマイシン(5 mg/kg)を経気道投与することにより作成した。そして、一酸化炭素を結合させたHb小胞体を投与し、その効果を組織病理学的に検討した。(9)ラットに人工赤血球を投与した後の脾細胞は、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。これに関連し、T細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインをBioPlexにより網羅的に測定した。(10)“出血性ショック心臓”モデルをラット用いて作成し、生理食塩水、5%アルブミン、赤血球による蘇生を行った。そして、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 (OMP)で興奮伝播・活動電位持続時間不均一性(Action potential duration dispersion: APDd)、致死性催不整脈性を検討した。また、心筋組織のconnexin 43 (Cx43)発現を免疫組織染色にて検討した。

C. 結果

(1) Hb小胞体の製造において、混練法を用いるHb溶液の内包プロセスについて継続して検討している。奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設

置し、その中に6ftのクリーンベンチを導入し、定期的に試験製造できる状態が整った。脂質量40g、高純度高濃度Hb溶液140 mLをもとに、10分弱程度の混練操作で約300-400mLのHb小胞体を繰り返し製造している。(2) Hb小胞体について、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なった。突然変異は認められなかった。(3) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程として、-プロピロラクトン(BPL)の添加が有効であることを確認している。今年度は芽胞の不活化させるため、芽胞を発芽させてBPLを添加する方法を検討したが、効果は限定的であった。(4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なった。全例が生存し、食餌量、運動量の回復も比較の赤血球投与と同等であり、アルブミン投与とは対照的であった。また、臓器のHIF-1発現量も低いことから、出血時にHb小胞体を投与して組織が酸素化されている事が重要と考えられた。(5) 毛細管内に分散する人工赤血球は、色素レーザー照射法におけるターゲットになりうる。鶏冠を血管腫モデルとして用い、人工赤血球を投与してレーザー照射したところ、標的部に強い炎症反応を生起することが解り、レーザー治療への応用の可能性が明らかになった。(6) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を行った。保存中の血液ガス組成(PO₂, PCO₂, 乳酸値)から組織は酸素代謝を維持していることを確認した。常温8時間保存後再接合を行った例で、移植後約100日の生着を確認した。(7) 高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与した。健常動物と同様にHb小胞体の大部分は肝臓・脾臓に分布したが、投与後14日目には約5%の放射活性が肝臓において確認されたものの、その他の臓器では消失していた。血漿中に約3%の放射活性が確認されたが、これはHb小胞体の脂質膜が代謝・排泄される過程においてHDL-コレステロールなどに取り込まれた³Hが検出されていると推測された。(8) 一酸化炭素を

結合させたHb小胞体の特発性肺線維症 (IPF)モデルマウスに投与した。肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認された。(9)ラットに投与後、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。本年度はT細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。産生が増加するものとして、主としてマクロファージが産生する、CC-chemokine, IL-10, TNF- α およびTh1サイトカインであるIFN- γ , IL-2が明らかになった。産生誘導が認められないものとしてIL-1 β , IL-18, Th2 cytokineであるIL-4, 5, 13が明らかになった。また、リポソームを貪食したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをコントロールマクロファージと比較し、貪食後に発現の増強を認める遺伝子群を同定した。(10)出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。ラット出血性ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミンによる蘇生を行なったところ、著明な左心室伝導遅延と興奮伝播・活動電位持続時間不均一性の増大及び心筋組織のconnexin 43発現異常を惹起し、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。赤血球治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。

D. 考察

(1) 混練法によるHb小胞体の調製のスケールアップを試み、結果としてHb回収率60%で粒子径250nm程度のHb小胞体分散液約300 mLを一回の混練操作でしかも短時間(10分)で得ることができた。混練法に用いる容器は、現在の20倍までのスケールアップが可能である。混練操作自体は、バッチ式となるが、一回の操作時間が極めて短いので、容器を複数準備して繰り返し行なうことにより、量産にも十分に対応が可能と考えられる。奈良医大に奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設

置し、その中に6ftのクリーンベンチを導入し、定期的に試験製造できる状態が整った。既に、混練法による造粒のあと脱CO操作、脱酸素操作も対応可能であることを確認し、4バッチ分の製造を今年度に終えている。次年度も継続して製造する予定である。(2) Hb小胞体について、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なった。突然変異は認められず、Hb小胞体の安全性が確認された。厚労省で開催された中間ヒアリング(平成26年2月26日実施)では、審査員より、本試験の必要性について質問があった。人工赤血球製剤の構成成分の主成分はヘモグロビン、脂質、ビタミンB6であり、生体適合性が高いと考えている。しかし、負電荷脂質であるDHSGは、グルタミン酸を骨格とし、これに二本のヘキサデシルアルコールがエステル結合し、そして一つのコハク酸がアミド結合した物質であり、医薬品として使用された実績も無い。また、Hb小胞体に内包された高純度Hb溶液は、自動酸化によってO₂⁻, H₂O₂などの活性酸素種を産生する。従って、突然変異の可能性についてこれまで検討したことが無い以上、懸念を払拭するためには試験すべきものと考え実施し、安全性が確認された。(3) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程として、 β -プロピロラクトン(BPL)の添加が有効であることから、今年度は芽胞の不活化させるため、芽胞を発芽させてBPLを添加する方法を検討したが、効果は限定的であった。これは、芽胞が存在する雰囲気は脱酸素化された条件であることや、脂質や蛋白質は多く存在するものの、分散媒が生理食塩水であるため、発芽には不適な条件であったことが考えられる。これまでの結果から、Hb小胞体の滅菌工程については、BPLを添加する方法は滅菌を促進はするものの、完全な滅菌を保証するものでは無いことが解った。従って、継続して他の無菌化法を今後も探索する必要がある。しかし、我々は無菌試験によって菌が無いことを実証したHb小胞体を何度も製造しているので、製造工程を完全な無菌管理下に置く事に

よりHb小胞体は製造出来るものと考えている。(4)片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なった。全例が生存し、食餌量、運動量の回復も比較の赤血球投与と同等であり、アルブミン投与とは対照的であった。また、臓器のHIF-1発現量も低いことから、出血時にHb小胞体を投与して組織が酸素化されている事が重要と考えられた。肺全摘による呼吸機能低下状態でもHb小胞体が有効に機能し、外科的侵襲からの回復過程に深刻な影響を与えなかった。(5)人工赤血球を生体に投与することで、レーザー光の血管選択性(血管に光が吸収され、他の皮膚構造物に吸収されないこと)が向上することが、*in vivo*, *in vitro*, 光学的観察、組織学的観察から示された。より多くの熱エネルギーが標的とする血管に選択的に蓄積されことから熱傷などのレーザー治療の合併症を軽減することが可能になり、レーザー治療の安全性向上に寄与することが示唆された。(6)ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を行った。保存中の血液ガス組成から組織は酸素代謝を維持していた。ET-Kyoto単独での灌流は、初期の段階で組織が代謝を停止、壊死したものと考えられた。Hb小胞体が酸素を供給することにより8時間の保存後の再接合術が可能であることを確認した。(7)高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与した。健常動物と同様にHb小胞体の大部分は肝臓・脾臓に分布したが、投与後14日目には約5%の放射活性が肝臓において確認されたものの、その他の臓器では消失していた。血漿中に約3%の放射活性が確認されたが、これはHb小胞体の脂質膜が代謝・排泄される過程においてHDL-コレステロールなどに取り込まれた³Hが検出されていると推測された。生活習慣病である高脂血症時におけるHb小胞体の安全性(生体蓄積性)を体内動態学的観点より初めて明らかにした。今後、血液学的評価や組織学的評価を含めた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)における詳細な安全性を明らかにしていけると考えられる。これらの検討項目については、次年度に行っていく予定である。(8)一酸化炭素(CO)を結合させたHb小胞体を特発性肺線維症(IPF)モデルマウスに投与した。肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認され、IPFの新規治療薬としての可能性が見出された。Hb小胞体は、COの有用なキャリアとなりうることから、CO-Hb小胞体はIPFの新規治療薬としてだけでなく、炎症や活性酸素が関連する多くの疾患の治療薬候補として有望ではないかと考えられる。来年度以降にCO-Hb小胞体の更なる可能性について追及していこうと考えている。

(9)ラットに空リポソーム溶液を循環血液量の20%(v/v)相当の量を投与した後に、脾臓を取り出し、Con A刺激を加えて培養し、サイトカイン・ケモカインの産生動態の変化を網羅的に観察した。ケモカイン・一部のT細胞由来サイトカイン、IL10, TNF-, IFN- の産生亢進が観察された。特に、主としてマクロファージ由来と考えられるケモカインの産生増強は、リポソームのマクロファージへの一過性の影響の一端を反映しているものと思われる。得られた結果は、リポソーム貪食マクロファージが、貪食後もその機能を保持していることも示している。また、リポソーム貪食マクロファージに特有な遺伝子プロファイルが示され、その中から、T細胞増殖抑制作用に関与する候補遺伝子と考えられるものが同定された。CD276は、B7-H3分子と同じものであり、免疫応答の制御に関わる分子である。その機能に関しては、T細胞機能を促進するという報告と抑制するという報告の相反する2つの報告がある。我々の系においては、B7-H3がT細胞の増殖を抑制する事に関与している可能性があるため、今後B7-H3の役割について、検討を進めていきたいと考えている。(10)出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。

ラット出血ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミンによる蘇生を行なったところ、著明な左心室伝導遅延と興奮伝播・活動電位持続時間不均一性の増大及び心筋組織のconnexin 43発現異常を惹起し、電気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。赤血球治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。このモデルは、Hb小胞体の有効性を評価するのに適したものと考えられ、次年度に継続して検討する予定である。

E . 結論

平成25年度の進捗状況として、先ず製造法については奈良医大にも無菌状態で製造できる環境を整備し、混錬法による造粒、光反応による脱CO操作、脱酸素化工程を繰り返し可能であることを確認し、4バッチ分の製造を完了した。輸血代替としての安全性については、先ず遺伝子突然変異誘発性は無いことが確認された。細網内皮系への影響について、人工赤血球は脂質成分を多く含んでいることから、高脂血症時の投与には何らかの影響が出ることが懸念されていたが、高脂血症モデルへの投与試験では体内動態に異常は認められなかった。また、脾T細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインの変動、マクロファージが発現増強する遺伝子群を同定した。機能評価としては、術中出血モデルへの投与において、組織酸素化と予後の回復において人工赤血球の効果が確認されたこと、また、臓器灌流試験では切断下肢を人工赤血球で灌流することにより再接着が可能であることが明らかになった。一酸化炭素を結合した人工赤血球が、肺線維化症の治療に有効であることも解って来た。

人工赤血球製剤の開発企業の探索を精力的に実施しており、現在も数社と協議しているが、まだ決定していない。そのため、技術移転作業やGLP製造設備の設置に至っていないので、全体的に計画に遅れが出ている。しかし、これまでの検討で製造工程や検査法の課題が極

めて明確になっていたもので、その課題に焦点を充てて研究を進めている。Non-GLP製剤は奈良医大で定常的に製造できる体制となり、これをもとに先見的な動物投与試験を実施し、安全性・有効性を実証している。実施企業への円滑な技術移転・GLP/GMP製造、非臨床/臨床試験の移行に備えている。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

各分担研究報告書に詳細を記載。

H . 知的財産権の出願・登録状況

(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. メト化防止剤を含有する人工酸素運搬体 4,763,265
3. 配位子置換型輸液製剤 5,020,525
4. US Patent 6,864,094: Method of preserving oxygen infusions.
5. Canadian Patent CA2383977: Method of preserving oxygen infusions.
6. US Patent 7,417,118: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier
7. European Patent 1,466,649: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier
8. PCT/JP2012/59233 (2012年4月4日出願): 小胞体の製造法. (2013年度に国内段階移行完了: 米国, インド, 中国, EP, 日本)

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の製造法に関する検討
- 2．ヘモグロビン小胞体の細菌を用いる復帰突然変異試験
- 3．ヘモグロビン小胞体製剤の無菌化に関する検討
- 4．肺切除術後出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体の投与効果
- 5．人工赤血球を利用してport-wine stainのレーザー治療成績を向上させる研究
- 6．ヘモグロビン小胞体による切断下肢の灌流と再接着試験

研究代表者	酒井 宏水	奈良県立医科大学医学部化学教室・教授
研究協力者	高折 益彦	川崎医科大学・名誉教授
	小林 紘一	慶應義塾大学医学部・名誉教授
	堀之内宏久	さいたま市立病院・部長（慶應義塾大学医学部・客員講師）
	河野 光智	慶應義塾大学医学部・講師
	荒木 淳	東京大学附属病院形成外科・医師
	岩本美智子	医療法人川村病院・医師
	力久 直昭	千葉労災病院形成外科・医師

研究要旨：1) 従来のHb小胞体の製造において、混練法を用いるHb溶液の内包プロセスについて継続して検討している。本年度は奈良医大にクリーンブース(class 10,000)を設置し、定常的に試験製造できる状態になった。2) Hb小胞体について、細菌を用いた復帰突然変異試験(Ames試験の変法)を行なった。突然変異は認められず、Hb小胞体の安全性が確認された。3) 微粒子分散系であるHb小胞体の無菌化工程として、 β -プロピロラクトン(BPL)の添加が有効であることを確認している。今年度は芽胞の不活化させるため、芽胞を発芽させてBPLを添加する方法を検討したが、効果は限定的であった。4) 片肺切除出血マウスモデルを用い、人工赤血球の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なった。人工赤血球の投与により全例が生存し、食餌量、運動量の回復も赤血球の投与と同等であり、アルブミン投与とは対照的であった。また、臓器のHIF-1 発現量も低いことから、出血時に人工赤血球を投与して組織が酸素化されている事が重要と考えられた。5) 毛細管内に分散する人工赤血球は、色素レーザー照射法におけるターゲットになりうる。鶏冠を血管腫モデルとして用い、人工赤血球を投与してレーザー照射したところ、標的部位に強い炎症反応を生起することが解り、レーザー治療への応用の可能性が明らかになった。6) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を行った。保存中の血液ガス組成から組織は酸素代謝を維持しており、これにより8時間の保存後の再接合術が可能であることを確認した。

1. ヘモグロビン小胞体の製造法に関する検討

A. 緒言

リン脂質小胞体の製造方法としては、超音波照射法、有機溶媒を用いる逆相法、界面活性剤を用いて分散させた後これを透析で除去する方法などが知られている。しかし、Hbのような機能蛋白質を扱い、且つ、血管内投与を前提とした製剤の製造においては、工程中の蛋白質の変性や、残存物質の懸念があり、これらの方法は向いていない。また、一般的なりポソーム製剤と比較して大量投与を前提とする人工赤血球製剤の製造法としては、効率が極めて低い。人工赤血球の粒子ひとつの性能を表すパラメータとして、単位脂質重量に対するHb重量の比が使われる。この値が高いほど、Hbに結合した酸素を効率よく運搬できることになる。そのためには、粒子の内水相のHb濃度を出来るだけ高くすることが必要であり、要するに高濃度(例えば35-45 g/dL)のHb溶液中に複合脂質を分散させて、小胞体が形成される時にHbを濃度が高い状態で内包させることが要件となる。高濃度Hb溶液は粘度が高く、そこに脂質粉末を分散させると更に粘度が高くなる。

これをいわゆる押し出し法(Extrusion Method)によって孔径の異なるフィルタを段階的に(例えば、Millipore社製MFフィルタ、孔径3.0 μm , 0.8 μm , 0.6 μm , 0.45 μm , 0.3 μm , 0.22 μm の順で)透過させて粒子径を調節する場合は、フィルタの交換が煩雑である上に、フィルタの目詰まりが起こり易い。それを回避するために、脂質を予め水溶液中で小胞体を形成させて凍結乾燥して得られた粉末を使用する方法が知られている(Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. *Biotechnol Prog.* 2003; 19(5): 1547-1552)。しかし、水を凍結乾燥で除去する操作は極めて長時間を要し、またコストもかかり、産業化を考えた場合には効率が悪いことが課題となった。また、粒子径の小さい乾燥小胞体が混在し、これはHb溶液に分散させた後、Hbを十分に内包せ

ずに最後まで残ってしまう場合があった。粘稠な濃厚Hb溶液に添加できる乾燥脂質の重量も攪拌効率や押し出し法の効率の面で制約を受け、せいぜい6 g/dLが上限であった(6 gの脂質を1 dLの濃厚Hb溶液に分散させること)。攪拌後に大量に発生する泡を消去するのに時間が要すること、また泡が蛋白質の変性を助長すること、脂質粉末が完全に分散せずに塊になって残存することも課題であった。

また、乾燥した複合脂質粉末を粘稠な濃厚Hb溶液に分散させる方法として、プロペラ式攪拌器を用いる方法は、脂質塊が形成されることがあり結果として長時間を要すること、また脂質粉末が水和するとき発生する気泡は粘稠溶液中ではなかなか消えず、これが押し出し法におけるフィルタの通過性を低下させることや、分散しきれなかった脂質塊がフィルタ上に残り損失となることも問題であった。Hbの回収率はせいぜい20%となり、内包されなかったHbは、再度回収して再濃縮して再利用するか、あるいは廃棄せざるを得ず、極めて効率の悪いものであった。

また、粘稠なHb溶液-複合脂質分散液を、マイクロフライダイザー法によって、高圧高速で対面に噴出させて衝突させて剪断応力を発生させ、それにより粒子径を小さくする方法が知られている(Beissinger RL, Farmer MC, Gossage JL. *ASAIO Trans.* 1986; 32: 58-63)。しかしこの方法では、剪断応力の調節が難しいこと、また、Hb脂質分散液を回路に通すためにある程度の流動性が必要であり、従って脂質の濃度を6 g/dL程度にまで低下させることが必要であり、結果としてHbの回収率は20%程度と低いものであった。

また、脂質粉末を予め少量の水で乳化、水和膨潤させてペーストを形成し、これをHb溶液と高速に混合・乳化することでHbを内包させる方法も知られている(特許文献;特開2009-035517号公報)。しかし、乾燥脂質を少量の水で水和させた際に既に小胞体が形成され、それがHb混合後もHbを内包することなくそのまま残る可能性が

あり、結果としてHbを効率よく内包できず、Hbの内包効率が低下することが予想される。

そこで我々は昨年度より「混練法」による人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の新しい製造方法を検討している。ヘモグロビンの回収率を従来よりも格段と高め、工程を簡略化し、操作時間を短縮でき、また、生体適合性を高めることもできるリン脂質小胞体（リポソーム）製剤の製造方法を提供することを目的としている。粒子ひとつひとつの酸素運搬機能を上げるには、やはり乾燥した複合脂質粉末を濃厚ヘモグロビン溶液と直接的に混合することが重要である。効率よく「多量の嵩高い乾燥状態の複合脂質粉末」と「粘稠な濃厚ヘモグロビン溶液」を混合し、濃厚ヘモグロビン溶液を小胞体に内包し、且つ粒子径を調節し、且つヘモグロビンの回収率を高めることができる。今年度は、酒井が研究の拠点早稲田大学重点領域研究機構(早大シンガポール研究所)から奈良県立医科大学化学教室に移したので、先ず化学教室内にクリーンブース(エアシャワー付、Class 10,000)を設置し、その中に6ft幅のクリーンベンチを設置。そして早大シンガポール研より研究器材、製造器材等に移設し、奈良医大にて定常的に人工赤血球が製造できる環境を整えた。そして、大型混練装置を用い、40gの脂質重量から混練するスケールアップを行い、最適化を試みるとともに、脱CO操作、脱O₂操作を経て、製剤化する一連の操作が可能であることを確認した。

B . 研究方法と結果

クリーンブース(内寸:横 2.85 m x 縦3.2m x 高さ 2.13 m)は日本エアテック社のclass 10,000の性能のものを導入した。その中に、横幅6ftのクリーンベンチを装備した(Fig. 1)。人工赤血球の製造に関する操作は全てクリーンベンチ内にて行なった。クリーンブース内の清浄度は常にparticle counterでモニタリングし、class 10,000以上であることを確認している。



Figure 1. 人工赤血球調製用のクリーンブースとクリーンベンチ (奈良医大 化学教室内)

複合脂質として 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC)、cholesterol、1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-glutamate (DHSG)、ならびに 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanol-amine-*N*-Poly(oxyethylene)₅₀₀₀ (DSPE-PEG₅₀₀₀、PEG鎖の分子量5000)がモル比で5/4/0.9/0.03となるように混合された脂質を用いた。テフロン製のシンキー社製の円柱状容器(内径90mm、内壁を凹凸を加え容器上から見た時にクローバー形になっているもの)に上記混合脂質粉末40gを入れ、高純度ヒトHb溶液(一酸化炭素結合-HbCO体、40-42 g/dL、1.4 dL、pH7.4)を添加した。そして、内蓋をして封入し、混練装置(自転公転攪拌器、シンキー社製、ARE-500)にて混練処理し、冷却に3分待ったあと、

容器内の気相を完全に一酸化炭素ガスで置換して封入した。そして、再度、公転800-1000回転にて混練処理を行なった。容器外表面の温度を赤外線温度計にて測定した。次いで、冷却した生理食塩水を添加し、回転させ、ペーストの粘度を低下させ、分散液とした。溶液を更に生理食塩水で最終的に4倍に希釈したあと、遠心分離(3000rpm、30分、Hitachi社製CF12RX)し、分散しきれていない粒子径の大きい分画の沈殿と、一部変性したHbを沈殿させた。上澄みの相について、孔径0.8 μ mのフィルタ(DISMIC)を透過させたあと、超遠心分離用の遠心チューブ(230mL容器)に入れ、更に生理食塩水を満たし、50,000gにて30分間超遠心分離し(Hitachi社製CP90WX)、得られた沈殿を生理食塩水に再分散させ、Hb濃度を約10 g/dLに調節した。ヘモグロビンの回収率は50-70%となった。粒子径はHORIBA製Nanoparticle analyzerを用いて計測し、中心粒径が220-270 nmであることを確認した。2dLずつ2L茄子型フラスコに入れてロータリーエバポレータにて回転させ、内部に空気を通気しながら、外部から可視光照射し、COガスを光解離させ、酸素が結合したHbに変換した。次いで、酸素を排除し、50mLバイアル瓶に分注した。

C . 考察

人工赤血球の調製法として、乾燥脂質粉末を濃度高く濃厚Hb溶液に均一に分散させ、且つ粒子径を小さくして調節し、且つHbの回収率を高め、且つ操作中のHbの変性を抑制することのできる、混練操作の原理を採用する方法を考案し、国際特許出願を完了している(PCT/JP2012/59233)。今年度は各国への特許申請に移行している。混練により成分が激しく攪拌されるため、試料の昇温が観察される。しかし、この昇温は脂質の分散にはある程度必要であることが解ってきた。用いている脂質の主成分であるDPPCの相転移温度が41 であることからこの温度以上にすることが好ましいこと、一方でHbCOの変性点が78 であることから70

程度までであれば、Hb変性を最小限に抑えて混練できる。現在では公転速度を1000回転に固定し、僅か10分程度で温度は60-70 に達し、高い分散性が得られ、Hb回収率も60-70%となった。今回のスケールでは、1 バッチで300 mLのHb小胞体が調製できた。

D . 結論

奈良医大にも製造装置等に移設し、混練法によるHb小胞体の調製を試みた。結果として、Hb回収率60-70%で粒子径250nm程度のHb小胞体分散液約300 mLを一回の混練操作でしかも短時間(10分程度)で得ることができた。混練法に用いる容器は、現在の20倍までのスケールアップが可能である。混練操作自体は、バッチ式となるが、一回の操作時間が極めて短いので、容器を複数準備して繰り返し行なうことにより、量産にも十分に対応が可能と考えられる。

2 . ヘモグロビン小胞体の細菌を用いる復帰突然変異試験

A . 緒言

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 (ヘモグロビン小胞体) 製剤は、血液と同等の濃厚な微粒子分散液である(ヘモグロビン濃度10g/dL, 粒子占有体積40%程度)。高純度高濃度ヘモグロビンをカプセル化することにより、ヘモグロビンの副作用を完全に遮断出来る。我々は1997年より厚生労働科学研究として本製剤の製造法、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の利用や、体外循環回路補填液としての有効性などを動物投与試験から明らかにしている。更に、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(がん、虚血性疾患、再灌流傷害、臓器保存)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あり得るので、生体に対する影響を動物投与試験などから注意深く検討してきた。人工赤血球製剤は従来に無い、大量投与を伴う製剤であるため、その安全性試験法のマニュアルは存在せず、研究班が中心になって試験法を考えるとところから先見的学術研究として進めてきた。これらの結果を総合すると、安全性は担保されており、次段階に進むべき製剤であると考えられる。しかし、臨床試験に向けて、非臨床試験項目のうち未だ手つかずであった、遺伝子突然変異誘発性の可能性の有無について、明らかにすることを目的とした。人工赤血球製剤の構成成分の主成分はヘモグロビン、脂質、ビタミンB₆であり、生体適合性が高いと考えている。負電荷脂質であるDHSGは、グルタミン酸を骨格とし、これに二本のヘキサデシルアルコールがエステル結合し、そして一つのコハク酸がアミド結合した物質である。また、精製Hbを内包したHbVは、metHb還元酵素系を持たないため、HbO₂の自動酸化の過程でごく微量ではあるがO₂やH₂O₂などの活性酸素を生じる。医薬品として使用された実績も無いので、突然変異の可能性については実施例が無い以上、試験すべきものと考えた。そこで、Hb小胞体の遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* の TA100, TA98, TA98, TA1535 及び TA1537, 並びに *Escherichia coli* の WP2uvrA を用い、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

本試験は、株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所にて実施された。

B. 方法

材料及び方法

1. 被験物質、媒体、陰性対照物質及び陽性対照物質

1.1. 被験物質

名称：人工赤血球(ヘモクロビン小胞体)

ロット番号：Deoxy-HbV 30-May-2013

性状：暗赤色微粒子分散液

保管条件：冷蔵

保管場所：試験施設の被験物質保管室の保管庫[冷蔵庫：BMS-500F3、日本フリーザー株式会社、設定温度：4°C(許容範囲：2.0~8.0°C)]

製造元：奈良県立医科大学 医学部

製造元：奈良県立医科大学 医学部

取り扱い事項：凍結厳禁

1.2. 媒体

名称：生理食塩液

規格：局方

ロット番号：M1A80

使用期限：2014年1月

保管条件：室温

保管場所：試験施設の被験物質保管室[設定温度：23°C(許容範囲：18.0~28.0°C)]

製造元：株式会社大塚製薬工場

製造元：株式会社大塚製薬工場

1.3. 陰性対照物質

被験物質の媒体である生理食塩液を用いた。

1.4. 陽性対照物質

名称：ポジコンAMマルチセット

セット番号：M0030

使用期限：2013年11月3日

保管条件：冷凍

保管場所：試験施設の超低温フリーザー[冷凍庫：CLN-35CW、日本フリーザー株式会社、設定温度：-80°C(許容範囲：-90~-70°C)]

製造元：オリエンタル酵母工業株式会社

製造元：オリエンタル酵母工業株式会社

製造元：オリエンタル酵母工業株式会社

下記にポジコンAMマルチセットの内容を記載した。

1.4.1.

2-アミノアントラセン

(2-aminoanthracene、略名：2AA)

1.4.1.1. 調製液

5 µg/mL (ロット番号：120404A205)、10 µg/mL (ロット番号：120404A210)

20 µg/mL (ロット番号：120404A220)、100 µg/mL (ロット番号：120404A2100)

製造日：2012年4月4日

媒体：ジメチルスルホキシド(以下DMSO、紫外外部吸収スペクトル用、ロット番号：CZ068、株式会社同仁化学研究所)

1.4.1.2. 原体

ロット番号：EPM0250

製造元：和光純薬工業株式会社

1.4.2. アジ化ナトリウム(sodium azide、略名：NaN₃)

16.1.4.2.1. 調製液

5 µg/mL (ロット番号：120404N)

製造日：2012年4月4日

媒体：注射用水(ロット番号：1A97、株式会社大塚製薬工場)

1.4.2.2. 原体

ロット番号：M0T4966

製造元：ナカライテスク株式会社

1.4.3. 9-アミノアクリジン(9-aminoacridine hydrochloride、略名：9AA)

16.1.4.3.1. 調製液

800 µg/mL (ロット番号：120404A9)

製造日：2012年4月4日

媒体：DMSO(紫外外部吸収スペクトル用、ロット番号：CZ068、株式会社同仁化学研究所)

1.4.3.2. 原体

ロット番号：HAX01

製造元：東京化成工業株式会社

1.4.4. 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide、略名：AF-2]

1.4.4.1. 調製液

0.1 µg/mL (ロット番号：120404AF01)、1.0 µg/mL (ロット番号：120404AF10)

製造日：2012年4月4日

媒体：DMSO(紫外外部吸収スペクトル用、ロット番号：CZ068、株式会社同仁化学研究所)

1.4.4.2. 原体

ロット番号：STQ3987

製造元：和光純薬工業株式会社

1.5. 被験物質及び陽性対照物質の取り扱い上の注意

被験物質は変異原性物質として取り扱い、被験物質及び陽性対照物質を使用する際には、マスク、手袋を着用し、吸入したり口から摂取したり、目や皮膚につけないように注意した。

1.6. 残余被験物質の取り扱い

残余被験物質は、試験委託者に返却した。

2. 検体液

2.1. 被験物質

2.1.1. 調製方法

用量設定試験及び本試験とも、被験物質原液を最高濃度(100%)とし、最高濃度液以下の濃度液は、最高濃度(100%)液の一部を生理食塩液で段階希釈して、用量設定試験では、30、10、3、1、0.3及び0.1%を、本試験では50、25、12.5及び6.25%を調製した。なお、用量設定試験及び本試験とも、被験物質調製液は用時に調製した。

Table 1. S9 mix（詳細については4.項参照）を必要とする陽性対照

試験菌株の種類	化学物質の名称	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g/plate}$)
TA100	2AA	10	1
TA1535	2AA	20	2
WP2uvrA	2AA	100	10
TA98	2AA	5	0.5
TA1537	2AA	20	2

Table 2. S9 mix を必要としない陽性対照

試験菌株の種類	化学物質の名称	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g/plate}$)
TA100	AF-2	0.1	0.01
TA1535	NaN_3	5	0.5
WP2uvrA	AF-2	0.1	0.01
TA98	AF-2	1	0.1
TA1537	9AA	800	80

2.1.2. 被験物質調製液の安定性及び濃度測定
被験物質調製液の安定性及び濃度測定は実施し
なかった。

2.2. 陽性対照物質

2.2.1. 使用濃度 (Tables 1, 2)

2.2.2. 使用方法

凍結保管されているものを試験の際に融解して
使用した。

2.3. 残余検体液の取り扱い

残余検体液は廃棄した。

3. 試験系

3.1. 菌株の種類及び選択理由

菌株の種類：

1) *Salmonella typhimurium*

TA98、TA100、TA1535、TA1537

2) *Escherichia coli*

WP2uvrA

選択理由：「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」に従い採用した。

3.2. 入手先及び入手日

1) *S. typhimurium* : TA98、TA100、TA1535、
TA1537

入手先：中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ
研究センター

入手日：TA98、TA100（1996年10月18日）

TA1535、TA1537（1995年2月25日）

2) *E. coli* : WP2uvrA

入手先：中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ
研究センター

入手日：1995年2月25日

3.3. 試験系の環境条件

菌株は -80°C で維持・管理され、試験には特性
検査がなされたものを使用した。菌株の特性とし
て「安衛法における変異原性試験-テストガイドラ
インとGLP-」1)に従い、アミノ酸要求性、紫外線
感受性、膜変異 rfa 特性及び薬剤耐性因子R-factor Φ

ラスミドの有無を検査し（TA100及びTA98の検査日：2011年7月20日～7月22日、TA1535、TA1537及びWP2uvrAの検査日：2012年7月31日～8月2日）試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した（Attachment 1）。また、実験操作は空調設備を有したAmes試験室（G棟）で行った。

3.4. 菌株の保管方法

S.typhimurium 及びE.coli とも特性検査の結果から選択したコロニーを培養し、2.5%ニュートリエントブロス溶液 [OXOID NUTRIENT BROTH No.2 (OXOID LTD.) 2.0 gに注射用水80 mLの割合で加え溶解した後、高圧蒸気滅菌（121°C、15分）して調製] に接種して、その菌懸濁液0.8 mLに対してDMSOを0.07 mLの割合で加えたものを、チューブ（2 mL容セラムチューブ、住友ベークライト株式会社）に200 µLずつ分注し、-80°C設定の超低温フリーザー（ULT-1386-5A、Kendro Laboratory Products）内に凍結保管した（TA100及びTA98の分注日：2011年8月9日、TA1535、TA1537及びWP2uvrAの分注日：2012年8月21日、使用期限：分注凍結後2年以内）。

3.5. 試験系の識別方法

菌株ごとに試験管及びプレートを油性インクで色分けし、識別した。

4. S9 mix

4.1. S9

ロット番号：13032213

製造日：2013年3月22日

購入日：2013年4月17日

製造元：オリエンタル酵母工業株式会社

保管方法：試験施設の-80 °C設定の超低温フリーザー（ULT-1386-5A、Kendro Laboratory Products）に凍結保管した。

誘導方法：（オリエンタル酵母工業株式会社発行の検定書より）

7週齢の雄ラット [CrI : CD (SD)] 74匹（体重：211.6 ± 10.0 g）に誘導物質としてphenobarbitalを1日目は30 mg/kg、2、3、4日目には60 mg/kgを腹腔内投与し、さらに3日目には5,6-benzoflavone 80 mg/kgを腹腔内投与して誘導した。

有効期限：2013年9月21日（当試験施設の基準：製造後6カ月）

抽出法：酵素誘導処理をしたラットの肝臓を氷冷で冷却しながらホモジナイズし、ホモジネートした肝臓を冷却高速遠心機により遠心（9000 × g、10分間）して上清画分（S9）を採取。

4.2. S9 mixの組成（1 mL中の量）

A . S9 0.1 mL

B . Cofactor - I （Lot No.999203、オリエンタル酵母工業株式会社）

MgCl₂ 8 µmol

KCl 33 µmol

グルコース-6-リン酸 5 µmol

NADPH 4 µmol

NADH 4 µmol

Na-リン酸緩衝液（pH7.4）100 µmol

C . 注射用水 0.9 mL

4.3. S9 mixの調製方法

試験当日にCofactor-I 1本につき注射用水9 mLを加えて溶解した後、メンブランフィルター（0.2 µm、NALGENE®）で濾過し、使用直前にS9を1 mL加えて調製した。

5. 菌株の前培養

菌株の前培養には、ニュートリエントブロス（OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号：987078、OXOID LTD.）2.0 gに注射用水80 mLの割合で加えて高圧蒸気滅菌（121 °C、15分）したニュートリエントブロス培養液を使用した。乾熱滅菌したモルトン栓付のL字管（容量：約40 mL）にニュートリエントブロス培養液を10 mL入れ、分注

Table 3. 生菌数

	生菌数 ($\times 10^9$ 個/mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.9	4.7	5.6	4.8	2.5
本試験	4.0	4.8	5.7	5.0	2.6

凍結菌液を融解してその20 μ Lを接種した。これを37 °C設定の往復振盪型式（振盪数：90回/分）の振盪培養器（MM-10、タイテック株式会社）を用いて、10時間培養した。培養終了後、菌懸濁液の濁度を分光光度計（Novaspec II、GEヘルスケア・ジャパン株式会社）を用いて測定し、そのO.D.値から生菌数を求めた。また、菌懸濁液は使用時まで室温で保管した。用量設定試験及び本試験における各菌株の生菌数をTable 3に示した。

6. 最少グルコース寒天平板培地

テスメディアAN培地（ロット番号：ANI140CC、製造日：2013年3月7日、オリエンタル酵母工業株式会社）を用いた。

テスメディアAN培地の組成

- A . MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g
citric acid · H₂O 2 g
K₂HPO₄ 10 g
NaNH₄HPO₄ · 4H₂O 1.92 g
NaOH 0.66 g
蒸留水 200 mL
- B . glucose 20 g, 蒸留水100 mL
- C . agar 15 g, 蒸留水700 mL

前記組成のA、B、Cをそれぞれ高圧蒸気滅菌した後、冷却して混合し、これを放射線滅菌したシャーレに30 mLずつ分注、凝固させたもの。

7. トップアガー

トップアガーは、注射用水にBacto Agar（ロット番号：2012231、DIFCO）が0.6%、塩化ナトリウムが0.5%の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌

（121 °C、20分）した。この水溶液に*S. typhimurium*の場合には0.5 mmol/L L-ヒスチジンと0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を、*E. coli*の場合には0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を、それぞれ容量比10：1の割合で加えて調製した。

8. 無菌試験

用量設定試験及び本試験実施の際に、被験物質の最高濃度液及びS9 mixの無菌試験をそれぞれ2枚のプレートを用いて実施した。試験は、被験物質の最高濃度液0.1 mL又はS9 mix 0.5 mLに、45 °Cに保温したトップアガー 2 mLを加えて最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ、プレートを転倒して37 °C設定の低温恒温器（IN802、ヤマト科学株式会社）内で約48時間培養した後、コロニーの出現を調べた。被験物質の最高濃度液の無菌試験には、用量設定試験及び本試験とも被験物質原液（100%）を用いた。

9. 試験方法

9.1. 試験操作（プレインキュベーション法）

乾熱滅菌した試験管（15.5 × 100 mm、清浄試験管ラルボ、テルモ株式会社）に、（1）被験物質調製液、陰性対照液あるいは陽性対照液0.1 mL、（2）高圧蒸気滅菌した0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液（pH7.4）0.5 mL（代謝活性化によらない場合）又はS9 mix 0.5 mL（代謝活性化による場合）、（3）菌懸濁液0.1 mLの順に加え、37 °C設定の往復振盪型式の振盪器を用いて20分間インキュベーションした。その後、45 °Cに保温したトップアガーを2 mL加えて混合した後、最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ、プレートを転倒して37 °C設定の恒温器（IN802、ヤマト科学株式会社）内で約48時間

培養した。

10. 用量設定試験

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

10.1. 試験方法

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

10.2. 試験濃度

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

10.3. 使用プレート数

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

10.4. 観察項目

10.4.1. プレート上での析出物の有無

培養開始時及び終了時に肉眼的に観察した。

10.4.2. 菌の生育阻害の有無

100倍の実体顕微鏡下で観察した。

10.4.3. 復帰変異コロニー数の計測

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

11. 本試験

11.1. 試験方法

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

11.2. 試験濃度

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

11.3. 使用プレート数

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

11.4. 観察項目

10.4.に示した方法で実施した。

12. 試験の成立条件

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

13. 統計学的方法

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

14. 判定基準

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

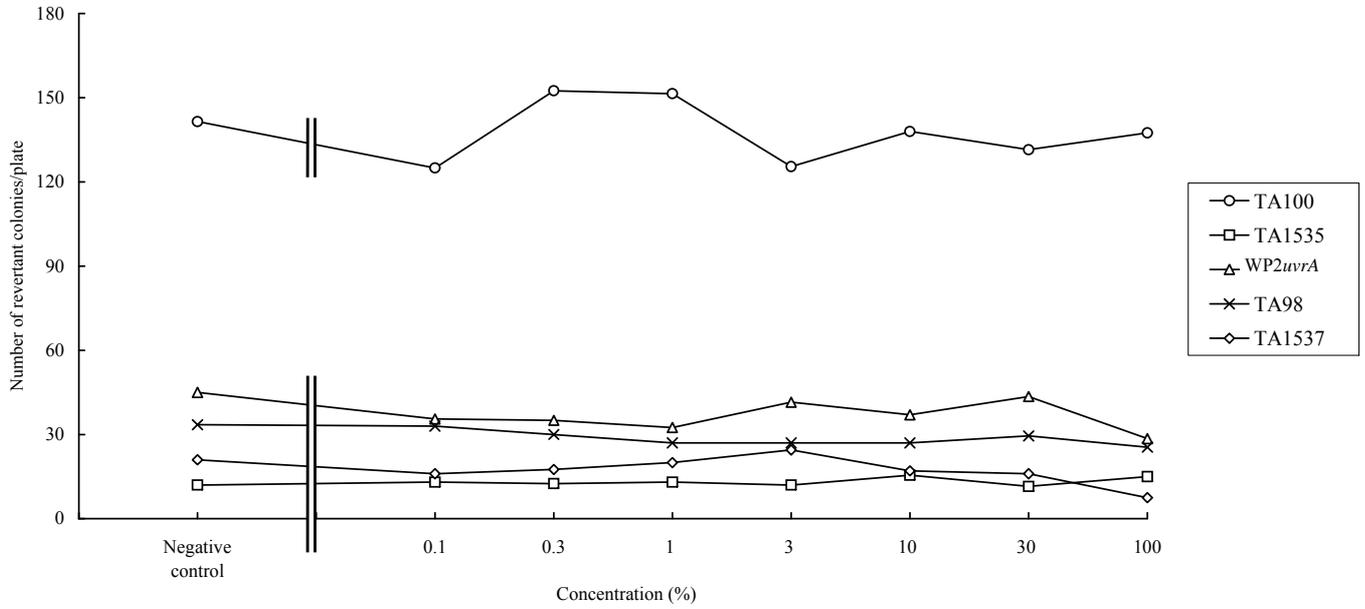


Figure 1-1. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(dose- finding test: without S9 mix)

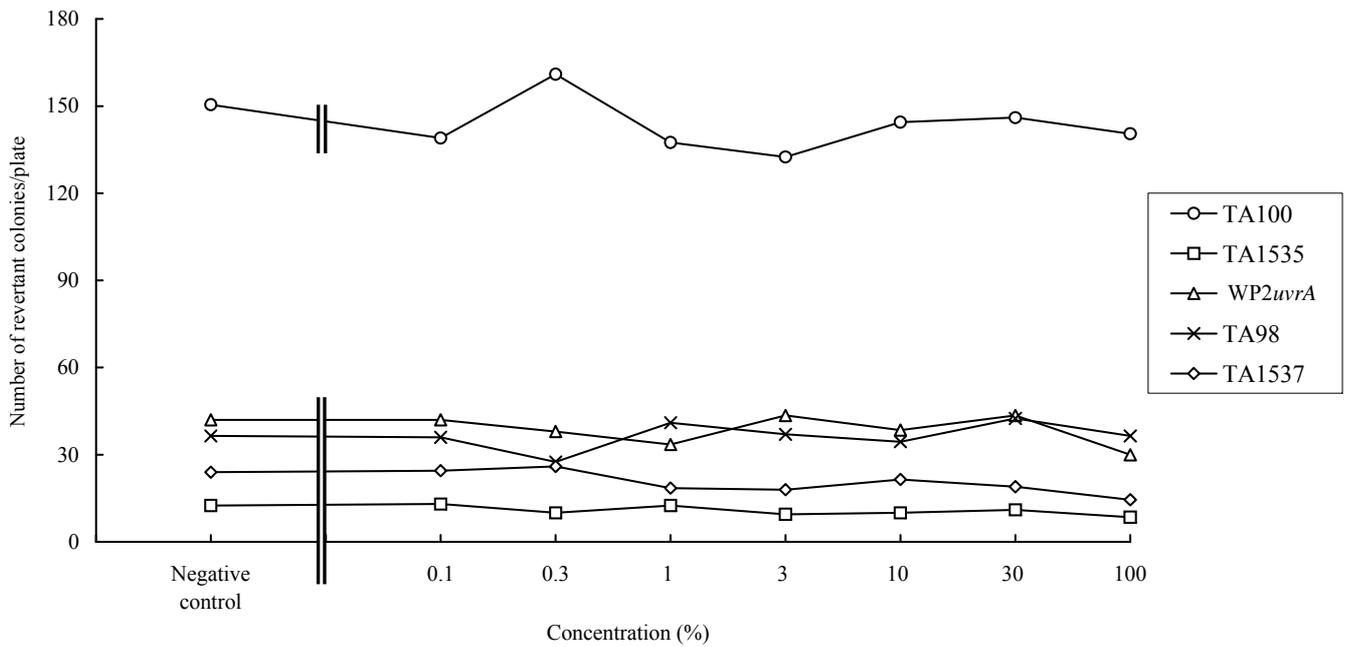


Figure 1-2. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(dose- finding test: with S9 mix)

Table 4-1 Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	140 143 (142)	11 13 (12)	40 50 (45)	32 35 (34)	18 24 (21)
	Artificial red cells	0.1	125 125 (125)	10 16 (13)	31 40 (36)	33 33 (33)	14 18 (16)
		0.3	144 161 (153)	10 15 (13)	33 37 (35)	29 31 (30)	16 19 (18)
		1	144 159 (152)	10 16 (13)	32 33 (33)	24 30 (27)	18 22 (20)
		3	120 131 (126)	7 17 (12)	41 42 (42)	27 27 (27)	23 26 (25)
		10	125 151 (138)	13 18 (16)	30 44 (37)	24 30 (27)	13 21 (17)
		30	128 135 (132)	11 12 (12)	42 45 (44)	27 32 (30)	16 16 (16)
		100	134 141 (138)	15 15 (15)	26 31 (29)	24 27 (26)	7 8 (8)
		Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	Concentration (µg/plate)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
Number of revertant colonies/plate	445 525 (485)		591 638 (615)	106 121 (114)	375 378 (377)	306 371 (339)	

Negative control : Saline.

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

(): Mean

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

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 4-2 Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	141 160 (151)	12 13 (13)	37 47 (42)	31 42 (37)	24 24 (24)
	Artificial red cells	0.1	139 139 (139)	12 14 (13)	41 43 (42)	34 38 (36)	22 27 (25)
		0.3	158 164 (161)	10 10 (10)	30 46 (38)	24 31 (28)	23 29 (26)
		1	127 148 (138)	11 14 (13)	32 35 (34)	40 42 (41)	13 24 (19)
		3	125 140 (133)	9 10 (10)	40 47 (44)	35 39 (37)	17 19 (18)
		10	139 150 (145)	9 11 (10)	36 41 (39)	34 35 (35)	18 25 (22)
		30	129 163 (146)	9 13 (11)	38 49 (44)	41 44 (43)	17 21 (19)
		100	128 153 (141)	8 9 (9)	28 32 (30)	34 39 (37)	11 18 (15)
		Positive control	Name	2AA			
	Concentration (µg/plate)		1	2	10	0.5	2
Number of revertant colonies/plate	1135 1187 (1161)		360 401 (381)	1113 1208 (1161)	451 454 (453)	193 212 (203)	

Negative control : Saline.

2AA : 2-Aminoanthracene.

(): Mean

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

No growth inhibition of tester strains was observed.

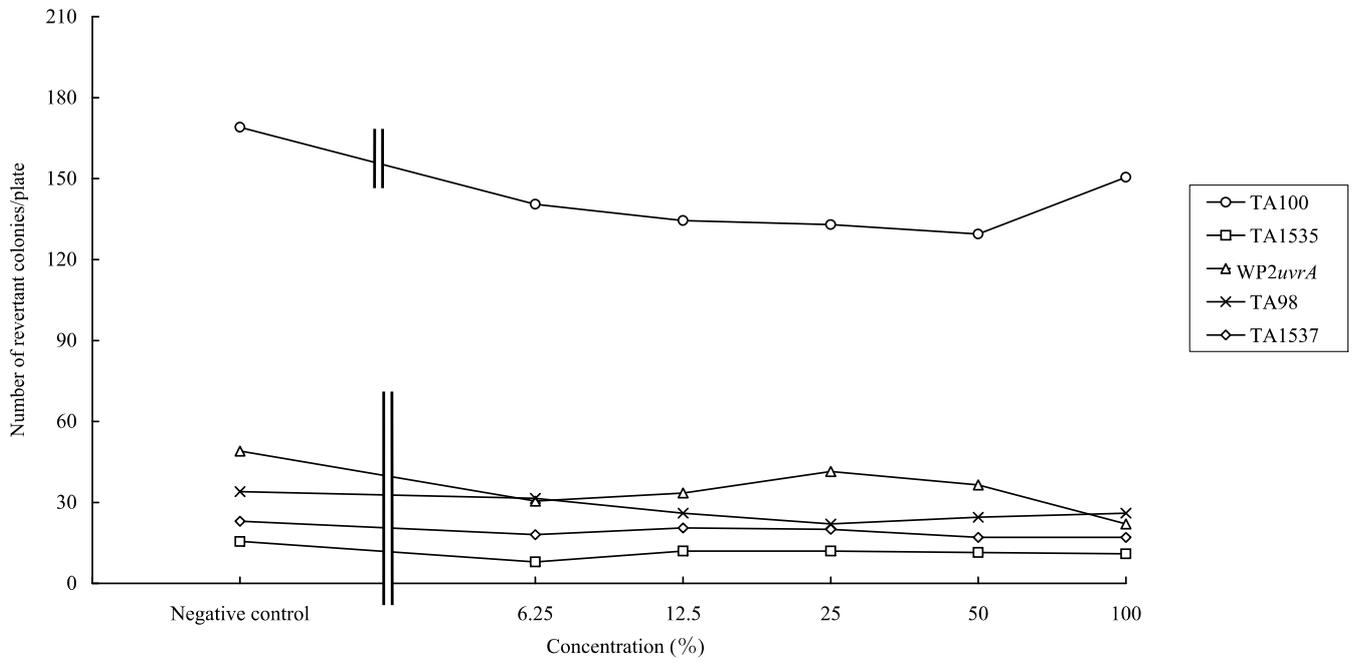


Figure 2-1. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria. (mutagenicity test: without S9 mix)

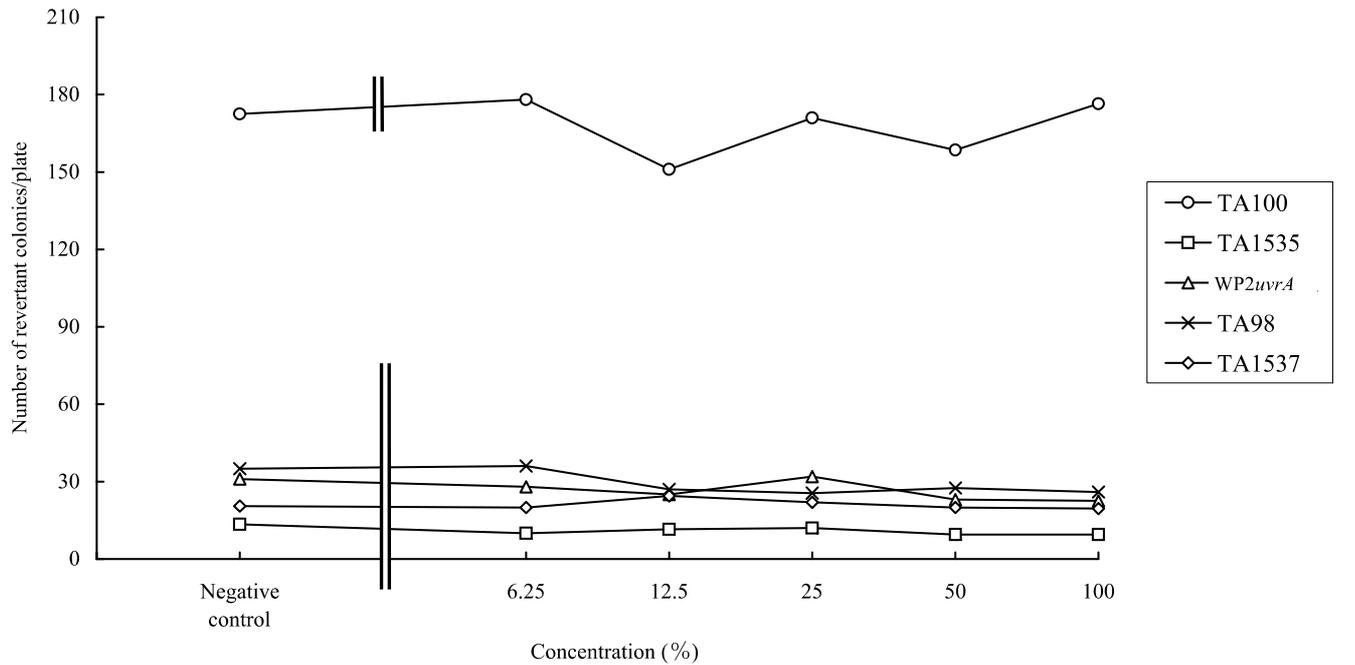


Figure 2-2. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria. (mutagenicity test: with S9 mix)

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

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

Negative control : Saline.

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

() : Mean

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

No growth inhibition of tester strains was observed.

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

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

Negative control : Saline.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean

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

No growth inhibition of tester strains was observed.

C . 結果

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

1.1. プレート上の析出物

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

1.2. 菌の生育阻害

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

1.3. 復帰変異コロニー数

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

1.4. 対照物質

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

1.5. 無菌試験

被験物質原液(100%)及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

2. 本試験(Table 5-1、5-2及びFigure 2-1、2-2)

2.1. プレート上の析出物

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

2.2. 菌の生育阻害

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

2.3. 復帰変異コロニー数

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

2.4. 対照物質

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

2.5. 無菌試験

被験物質原液(100%)及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

D . 結論

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

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

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

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

(参考文献)

労働省安全衛生部化学物質調査課(編): 安衛法における変異原性試験 - テストガイドラインとGLP

-、中央労働災害防止協会、平成3年3月

3. ヘモグロビン小胞体の プロピオラクトンによる殺菌効果に関する検討

A. 研究目的

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

B. 実験方法 (Test No. SN-2013-0560)

硝子バイアル瓶に封入したHb小胞体分散液(10mL, 計5本, 撪拌子入り)に対し、*Bacillus subtilis* spores ATCC 6633を0.1 mL添加した(10^6 colony forming unit (CFU)/0.1 mL)。バイアル瓶を37、または50にてインキュベートし(Table 1)、芽胞の発芽を促進させた。次いで、BPLをマイクロシリンジで5または10 μ L注入しそれぞれ、0.05または0.10%になるように設定した。10分程度撪拌したのち、37にて2時間インキュベートした(150 \pm 10 rpm)。その後、1 mLを9 mLの生理食塩水で段階的に希釈した。各希釈系列から1mLを採取し、滅菌済みのペトリ皿に

播種し(x 3)、20mLのSoybean-Casein Digest (SCD) agarを添加した。30-35にて5日間培養し、CFU (colony forming unit)を計測した。

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

(検体)

Hb小胞体分散液(Lot 30-May-2013)

(菌体)

Bacillus subtilis spores ATCC 6633

1.70×10^6 CFU/0.1 mL

Table 1. Test variables in each test run

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

C. 結果および考察

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

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

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

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

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

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

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

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

デオキシ型Hbの変性点は80 なので、温度の上げ下げでどこまで芽胞の増殖を抑えることができるか、検討する必要があると考え、今回、37 および50 にてインキュベートして発芽させることを試みた。しかし、Log Reductionは限定的であった。これは今回の発芽の条件が不十分であったことを意味している。これまでの結果から、Hb小胞体の滅菌工程については、BPLを添加する方法は滅菌を促進はするものの、完全な滅菌を保証するものではないことが解った。従って、継続して他の無菌化法を今後も探索する必要がある。しかし、我々は無菌試験によって菌が無いことを実証した

Hb小胞体を何度も製造しているのので、製造工程を完全な無菌管理下に置く事によりHb小胞体は製造出来るものと考えている。

4. 肺切除術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体の投与効果

A. 研究目的

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

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

B. 方法

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

C57BL/6マウスを麻酔後、頸動脈にカテーテルを挿入し、試料溶液で循環血液量の40%を交換する。

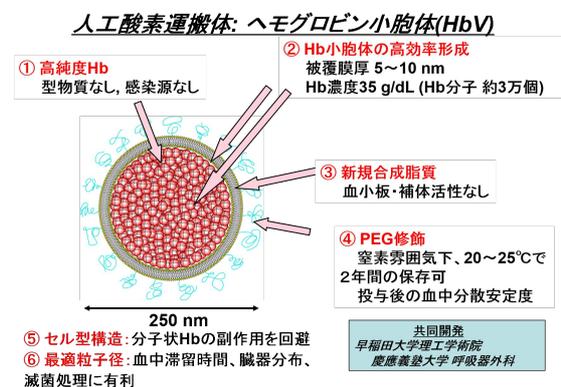


図1 ヘモグロビン小胞体の特徴

人工呼吸器下に左肺全摘術を施行する。輸血、輸液を替え以下の4群を作成する。

実験群

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

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

C. 結果

LR群は術後1日までに全例が死亡した。rHSA群は7日目の生存率が50%であったのに対し、sRBC群とHbV群では全例が生存した。rHSA群では術後3日目に体重が最低となったが、sRBC群やHbV群では減少率が低く、回復が早い傾向を認めた(図2)。HbV投与後、ヘマトクロット値や赤血球数の回復に影響はなく、白血球数や血小板数への影響も認められなかった。HbVは脾臓で捕捉されるため、

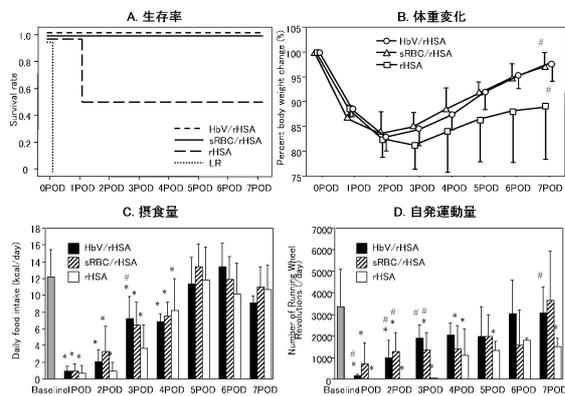


図2 マウス肺全摘術周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の効果

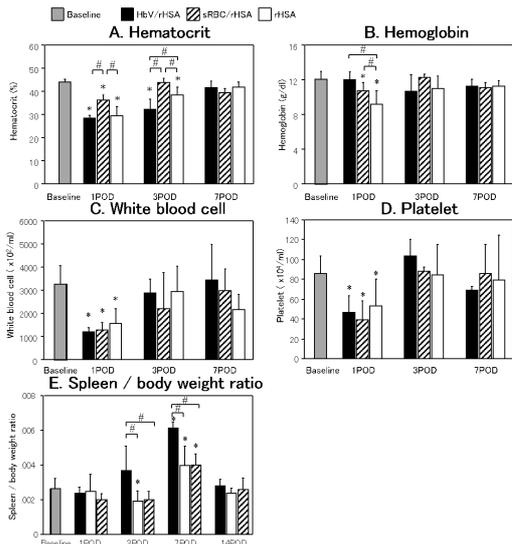


図3 マウス肺全摘術周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の血算および脾臓重量の変化

一時的に脾腫を認めるが、14日までには改善した（図3）。組織学的にrHSA群では肝細胞の空胞変性が著明で遷延したのに対し、sRBC群やHbV群では肝細胞の変性は限局的で7日目までには回復していた（図4）。HbV群では肝臓および腎臓でのHIF-1 α の発現がsRBC群と同等に抑制されていた（図5）。

D. 考察

HbVによる40%交換輸液では、肺全摘術後にマウス全例が生存し、主要臓器の低酸素も回避されていた。肺全摘による呼吸機能低下状態でもHbVが有効に機能し、外科的侵襲からの回復過程に深刻な影響を与えなかった。

E. 結論

HbV投与は肺切除手術の出血に対しても有効で

あると考えられた。

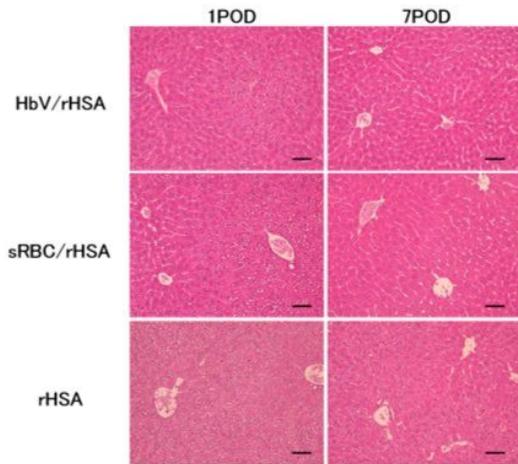


図4 マウス肺全摘術周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与後の肝臓の組織像

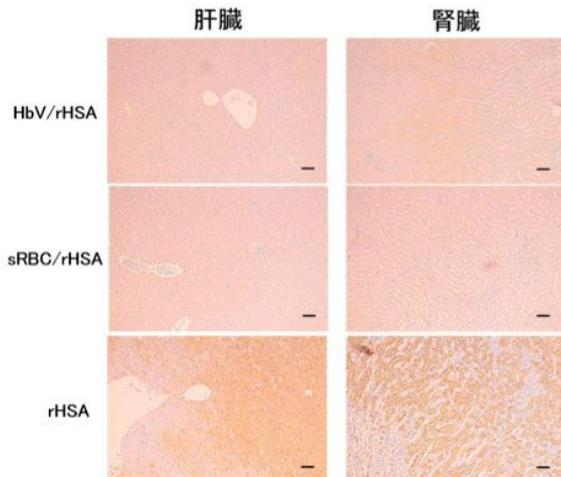


図5 マウス肺全摘術周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与後の肝臓及び腎臓でのHypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1 α)の発現

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

A. 研究目的

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

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

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

る。以下にレーザー治療に反応しにくい単純性血管腫の特徴を挙げる。

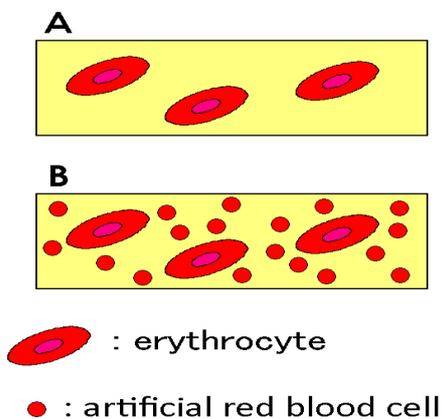
- 1) 病変が真皮層深部に存在する病変では、レーザー光が標的となる赤血球に届かないため治療効果が小さい。
- 2) 異常血管の血管径が非常に細い病変では、血管内の赤血球が少なく熱効果が十分発生しないので。治療効果が小さい。
- 3) 異常血管内の血液の流速が速い病変では、熱効果が血管壁に効率よく伝導しないため、治療効果が小さい。

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

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

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

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



本研究は、千葉労災病院形成外科・部長 力久直昭によって実施された。

B. 研究方法

1. 試験系およびセッティング

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

1966年であり、以来頻繁に動物モデルとして使用されている。

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

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

実験3: 環血液量の10%量の人工赤血球を塩酸タミソと塩酸キリジン混合液の腹腔投与と麻酔下にラットに静脈投与し、角膜毛細血管を顕微鏡で観察した。



図1 ラットの眼球を示す

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

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

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

B群),照射条件を4種類(6・8・10・12J/cm²,10ms),組織採取および観察時期を4回(照射直後,照射後4日目,10日目,15日目)とした。レーザー照射条件は、予備実験を繰り返し、照射によって直接血管が破裂してしまうことが少ない4設定とした。また組織標本にHE染色・AZAN染色・エラスチン染色(EVG)染色・鉄染色を行い顕鏡した。

C. 結果

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

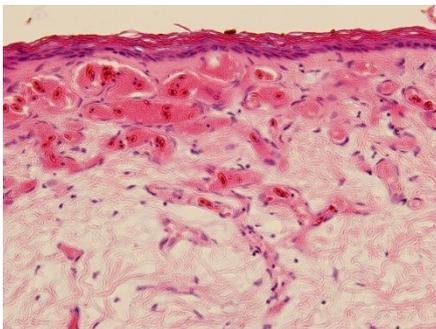


図2 人工赤血球投与群 400倍

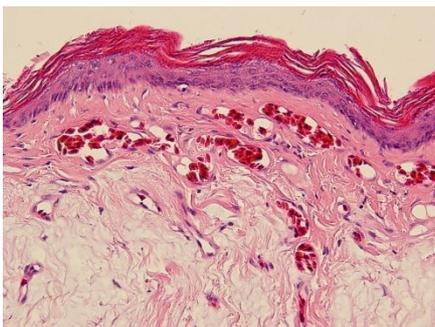


図3 非投与群 400倍

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

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



図4 人工赤血球投与前の鶏冠毛細血管



図5 人工赤血球投与後の鶏冠毛細血管



図6 人工赤血球投与前の角膜毛細血管



図7 人工赤血球投与後の角膜毛細血管

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

表 1 鶏冠の赤み測定結果

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



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

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

1.34倍～1.40倍となった。

表 2 測定結果

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

実験6：レーザー照射後経時的に組織を観察すると以下に示す変化があった。

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

また、人工赤血球投与の有無によって以下のような組織学的な差が観察された。

表 3 人工赤血球投与の効果

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

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

D. 考察

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

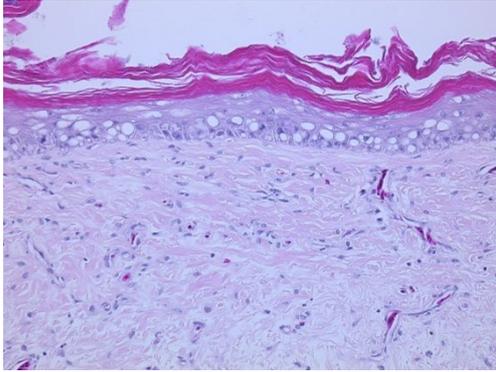


図9 人工赤血球非投与群レーザー照射後15日目の組織像（H E 染色 400倍）

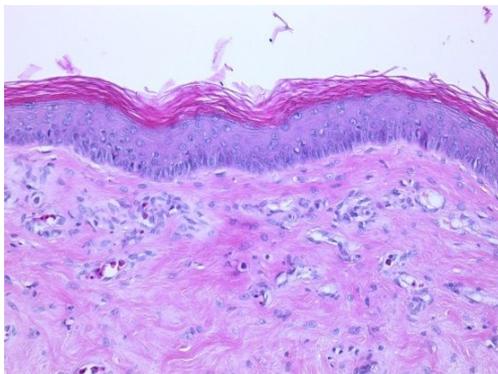


図10 人工赤血球投与群レーザー照射後15日目の組織像（H E 染色 400倍）

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

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

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

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

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

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

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

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

レーザー光の血管選択性が向上したと考えることができる。

E . 結論

人工赤血球を生体に投与することで、レーザー光の血管選択性（血管に光が吸収され、他の皮膚構造物に吸収されないこと）が向上することが、*in vivo*, *in vitro*, 光学的観察、組織学的観察から示された。より多くの熱エネルギーが標的とする血管に選択的に蓄積されことから熱傷などのレーザー治療の合併症を軽減することが可能になり、レーザー治療の安全性向上に寄与することが示唆された。今後は毛細血管の内皮を直接観察し、人工赤血球の投与によって標的血管が効率よく壊死に至るようになるか解析する予定である。

6 . 酸素輸送をする臓器灌流液としての人工赤血球の可能性について

A . 研究目的

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

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

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

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

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

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

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

B . 実験方法

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

C . 結果および考察

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

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

E . 研究発表

1 . 論文発表

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

(Reviews)

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

- fluids—a white paper. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 39, pp. 737-746 (2013, Dec).
3. T. Ikeda, H. Horinouchi, H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carriers as a resuscitative fluid for hemorrhagic shock: acute and long-term safety evaluation using beagle dogs. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 28, pp. 501-526 (2013, Dec).
 4. H. Azuma, M. Fujihara, H. Sakai. Biocompatibility of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, on blood cells and plasma proteins in vitro and in vivo. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 22, pp. 385-398 (2013, Dec).
 5. H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carriers to mimic the red blood cells structure. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 12, pp. 235-248 (2013, Dec).
 6. 酒井宏水, 堀之内宏久, 東寛, 小田切優樹, 小林紘一. 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の安全性試験. *人工血液* 21, 36-48 (2013)
 7. H. Sakai. Biocompatibility of a highly concentrated fluid of Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. In: Selective Topics in Nanomedicine (T.M.S. Chang ed.), pp. 133-147, World Scientific, Singapore (2013)
 8. 酒井宏水. 人工赤血球による生体組織への酸素輸送. 「全人力・科学力・透析力に基づく透析医学」平方秀樹 監修、医薬ジャーナル社. 大阪 (印刷中)
- ## 2. 学会発表
1. 酒井宏水 / 人工赤血球による生体組織への酸素輸送 (シンポジウム) / 第58回 日本透析医学会 学術集会 / 福岡国際会議場 / 2013.6.23
 2. 永尾紗理、田口和明、田中遼大、渡邊博志、酒井宏水、堀之内宏久、小林紘一、小田切優樹、丸山徹 / プレオマイシン誘発肺線維症に対する一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の有用性評価 (口頭発表) / 第38回西日本薬剤学研究会 / 九州地区国立大学九重共同研修所 / 2013/8/23-24
 3. K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, T. Maruyama, M. Otagiri / PRECLINICAL STUDIES OF HEMOGLOBIN-VESICLES AS AN ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER IN NON-HUMAN PRIMATE (poster) / 日本薬物動態学会 第28回年会 / 東京 : タワーホール船堀 / 2013/10/9-11
 4. H. Sakai, H. Horinouchi, H. Azuma, M. Otagiri, K. Kobayashi / Artificial red cells (Hb-vesicles) for blood substitutes and oxygen therapeutics / 14th International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Chengdu, China / Oct. 18-21, 2013
 5. K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, T. Maruyama, M. Otagiri / PRECLINICAL STUDIES OF

HEMOGLOBIN-VESICLES AS AN ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER IN NON-HUMAN PRIMATE (poster) / 14th International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Chengdu, China / Oct. 18-21, 2013

6. 太田英伸、李コウ、田口和明、大柿滋、泉仁美、稲垣真澄、岡村州博、小田切優樹、酒井宏水、八重樫伸生 / 妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた治療法の開発 (トピックス講演) / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
7. 河野光智、重信敬夫、神山育男、渡辺真純、堀之内宏久、酒井宏水、小林紘一 / 肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与とHIF-1 α の発現について / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
8. 東寛、酒井宏水 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)を構成する脂質二重膜のもつ免疫調節効果について / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
9. カ久直昭、渡邊彰二、佐藤兼重、酒井宏水 / 人工赤血球を利用してport-wine stainのレーザー治療成績を向上させる研究 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
10. 荒木淳、酒井宏水、加賀谷優、光嶋勲 / ラット後肢移植モデルを用いた人工赤血球の有用性に関する検討 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
11. 東寛、高橋弘典、永井一樹、長森恒久、高橋大輔、藤原満博、酒井宏水 / リポソーム投与後の脾細胞からCon A刺激により産生されるサイト

カイン・ケモカイン動態の網羅的解析 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.

12. 永尾紗理、田口和明、田中遼大、渡邊博志、酒井宏水、小田切優樹、丸山 徹 / プレオマイシン誘発肺線維症に対する一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の有用性評価 (口頭発表) * 優秀発表賞受賞 / 長崎国際大学 / 第30回日本薬学会九州支部大会 / 2013/12/7-8
13. 酒井宏水 / 人工赤血球(Hb小胞体)の新しい利用法の深求と、シンガポールにおける融合研究拠点の形成 / 第6回生物学・化学・情報科学融合のための戦略的先進理工学研究基盤の形成支援事業シンポジウム / 早稲田大学西早稲田キャンパス / 2013.12.14.
14. 酒井宏水 / 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)微粒子分散液の特徴 / 一般社団法人日本粉体工業技術協会 造粒分科会 平成25年度 技術討論会 / ライオン(株)伊豆高原研修センター / 2014. 3.7.
15. 酒井宏水、Li Bing、Lim WeiLee / 体内電子供与系の活用による人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の機能復元 / 日本化学会第94春季年会 / 名古屋大学 東山キャンパス / 2014.3.27
16. 矢野和彦、石上盛敏、酒井宏水、狩野繁之 / 人工酸素運搬体による重症マラリア合併症の補助療法の開発 / 第83回日本寄生虫学会大会 / 愛媛大学城北キャンパス / 2014. 3.27-28.

3. 報道など

1. 関西テレビ「スーパーニュースアンカー」 献血血液が将来的に不足することの解決策の一つとして、人工赤血球が紹介された

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

崇城大学薬学部

名誉教授

教授

研究要旨

(1) 高脂血症モデルとして ApoE 欠損マウスにヘモグロビン小胞体 (HbV) を単回大量投与し、体内動態及び生体蓄積性について評価を行った。ApoE 欠損マウスにトリチウム標識 HbV (^3H -HbV) を 2000 mg Hb/kg で投与したところ、健常動物と同様に HbV の大部分は肝臓・脾臓に分布していた。さらに、投与後 14 日目には、約 5% の放射活性が肝臓において確認されたものの、その他の臓器においては、放射活性はほとんど検出されなかった。また、血漿中においても約 3% の放射活性が確認されたが、目視上において血漿中に HbV は確認されなかったことから、HbV の脂質膜が代謝・排泄される過程において HDL-コレステロールなどに取り込まれた ^3H が検出されていると推測された。

(2) HbV に多くの生理活性を有する一酸化炭素 (CO) を結合させた CO 結合型 HbV (CO-HbV) の特発性肺線維症 (IPF) 治療薬としての可能性を探求した。その結果、CO-HbV 投与により肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認され、CO-HbV は IPF の新規治療薬としての可能性が見い出された。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 (生体蓄積性) を体内動態学的観点より初めて明らかにするとともに、HbV の CO キャリアとしての有用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の中で、前臨床段階として製剤化試験、薬理試験、薬物動態試験、さらには毒性試験など多くの段階を経て、その有効性と安全性を確立していく必要がある。我々はこれまでに、人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体 (HbV) の生体内挙動 (*Drug Metab Dispos.* 2009, 2011; *Drug Metab Rev.* 2011; *J Drug Metab Toxicol.* 2012) や大量出血時 (*J Control Release.* 2009)、肝硬変時 (*Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; *J Pharm Sci.* 2011)、妊娠時 (*Life*

Sci. 2012) などの一般的な薬物の安全性評価に準じて、HbV の安全性を明らかにしてきた。しかしながら、HbV は赤血球代替物であるため多種多様な罹患者へ投与することになる。加えて、HbV の1回あたりの投与量は数百 mL ~ 数 L におよび、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にもなる。そのため、HbV を投与した後に脂質成分、特にコレステロール、は如何なる場合においても安全に代謝・排泄されることが求められる。しかしながら、これまでの評

価は一般的な薬物と同様の安全性評価のみであり、生体蓄積性を示す可能性が想定される疾患時における安全性評価は乏しい。実際に、これまでに開発されてきた人工酸素運搬体であるパーフルオロカーボン (PFC) では1年以上にわたる臓器蓄積を示した結果、副作用を誘発した。

また、近年、一酸化炭素 (CO) は抗炎症作用や抗酸化作用などの多面的な生理活性作用を持つことから新規医療ガスとして臨床応用が期待されている。しかしながら、臨床応用に際しては、ガス分子であるCOの生体内コントロールを制御する必要があり、そのためには安全かつ安定にCOを供給できるキャリアが必須となる。そこで我々は、キャリアとしてCOに高い親和性を有するHbVに着目した。これまでにCO結合型HbV (CO-HbV) を用いたin vivoの検討において、生体内に投与されたCO-HbV中の一部のCOは最終的に肺を通過して呼気中に排出されることが動物実験で確認されている。したがって、CO-HbVを用いた肺へのCO送達が可能であると考えられる。

以上の背景より、本研究では、まず初めに脂質代謝に異常を持つ場合を仮定し、高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスを用いHbVの安全性を体内動態学的観点より評価を行った。次に、肺疾患の中でも難治性疾患であり新規薬物の開発が切望されている特発性肺線維症 (IPF) に対するCO-HbVの有用性評価を行った。

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. ApoE欠損マウスにおけるHbVの体内動態実験

2-1. 動物

実験動物はApoE欠損マウス (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。

2-2. ³H-HbV 投与液の調製

HbV 800 μL と cholesterol,[1,2-³H(N)]- 20 μL を混合し、24 時間室温で放置することにより ³H 標識を行った。動物実験における投与液は標識体を非標識体で希釈して調製した。

2-3. 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、³H-HbV 2000 mg Hb/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 日目に血液、臓器 (腎臓、肝臓、脾臓、心臓、肺) を回収した。

2-4. 採血方法、放射活性の測定・分析

ヘパリン処理した注射筒を用いて、投与後 1 日目、3 日目、7 日目及び 14 日目に下腹静脈から採血を行い、遠心分離により血漿を採取した。得られた血漿 50 μL を、soluene-350 / イソプロピルアルコール (1 : 1) 混合液 500 μL で可溶化後 (50 , 24 時間)、過酸化水素で脱色し、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) 8 mL を加え、放射活性を測定した (LSC-5121)。摘出した臓器は、秤量した後、その一部を soluene-350 1 mL で可溶化後 (50 , 24 時間)、血液と同様の処理により放射活性を測定した。

3. CO-HbV の IPF への有用性評価

3-1. 動物

実験動物は Sea-ICR マウス (オス、6 週齢) は九動より購入し実験に使用した。また、実験期間中は水及び固形飼料を自由に摂水及び摂食させた。

3-2. IPF モデルマウスの作成

Sea-ICR マウスに非絶食、抱水クロラル麻酔下において、プレオマイシン (5 mg/kg) を経気道投与することにより作成した。

3-3. CO-HbV の投与

プレオマイシン投与 30 分前及び 1 日後に生理食塩水、HbV (1400 mg Hb/kg) または CO-HbV (1400 mg Hb/kg) を尾静脈より投与した。

3-3. CO-HbV の投与

IPF モデルマウスにサンプル投与後、3 日目に肺胞洗浄液中の細胞数を、14 日目に肺線維化の評価 (Masson's trichrome 染色及びヒドロキシプロリン定量) 及び努力肺活量の測定を行い、治療効果の評価を行った。また、それぞれの評価は、定法に従って行った。

C. 結果および考察

1. ApoE欠損マウスにおけるHbVの体内動態

1-1. 一般状態

すべてのApoE欠損マウスにおいてHbV投与時に特記する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。

1-2. 体内動態

HbVを2000 mg Hb/kgでApoE欠損マウスに投与し、1, 3, 7, 14日後の血漿中及び各臓器 (腎臓、肝臓、脾臓、心臓、肺) への分布量を観察し、主要分布臓器及び蓄積性について評価した。

その結果、これまで明らかとなってきた健常マウスと同様にHbVの大部分は肝臓に分布していた (Fig. 1)。また、臓器g当たりの分布量を算出したところ、脾臓において高い分布を示した (Fig. 2)。これまでの健常動物を用いた検討において、HbVはクッパー細胞、脾臓マクロファージ

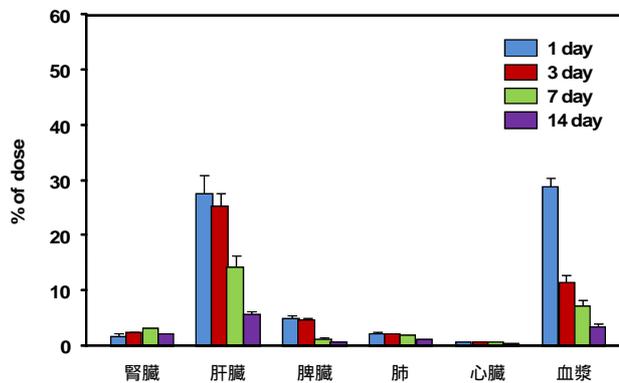


Figure 1 Tissue distributions (% of dose) of ^3H -HbV at 1, 3, 7, 14 day after administration to ApoE deficient mice at a dose of 2000 mg Hb/kg. Each point represents the mean \pm SD (n=5).

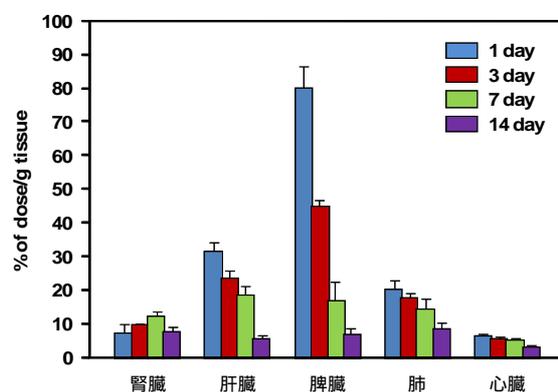


Figure 2 Tissue distributions (% of dose/g tissue) of ^3H -HbV at 1, 3, 7, 14 day after administration to ApoE deficient mice at a dose of 2000 mg Hb/kg. Each point represents the mean \pm SD (n=5).

などの細網内皮系細胞に取り込まれ、代謝を受けることが明らかとなっている。そのため、高脂血症時においても、HbVの代謝臓器として、主に肝臓・脾臓が担っている可能性が示唆された。また、投与後14日目には、肝臓より約5%の放射活性が確認されたものの、その他の臓器においては放射活性はほとんど検出されなかった。

また、血漿中においても約3%の放射活性が確認された。これは、HbVの脂質膜が代謝・排泄される過程においてHDL-コレステロールなどに取り込まれ代謝・排泄されている過程において検出されたと推測される。実際に、目視上において血漿中にHbVは確認されなかったことから、投

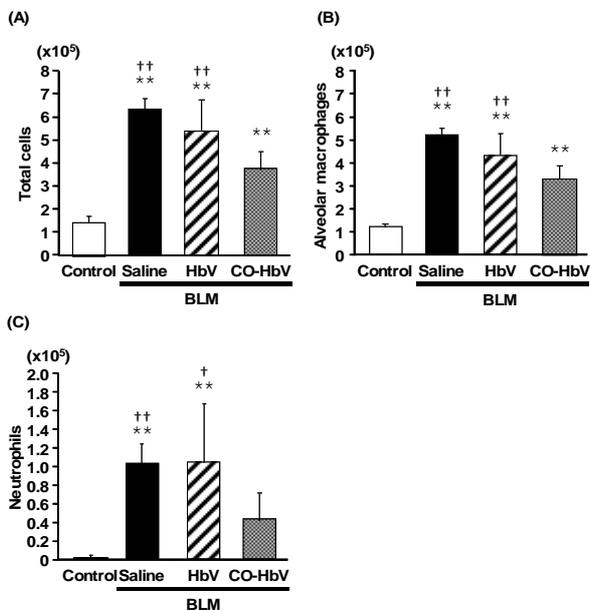


Figure 3 Effect of CO-HbV on cells in bronchoalveolar lavage fluid in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice. The number of inflammatory cells including (A) total cells, (B) alveolar macrophages and (C) neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid on day 3. These inflammatory cells were determined on day 3. Each value represents the mean \pm s.d. ($n=3-6$). ** $P<0.01$ versus control. †† $P<0.01$ versus CO-HbV. † $P<0.05$ versus CO-HbV.

与後14日目までには、HbV自身は完全に分解され、血中から消失している可能性が示唆された。これらの結果より、HbVは高脂血症時に大量単回投与 (2000 mg Hb/kg) しても投与後14日目には生体内より殆ど消失しており、生体蓄積性は少ないと推測された。

2. CO-HbVのIPFへの有用性評価

2-1. 肺胞洗浄液の評価

炎症性細胞の浸潤について気管支肺胞洗浄液中の細胞数を比較したところ、プレオマイシン投与により生理食塩水投与群において総細胞数の有意な増加がみられた (Figure 3A)。また、細胞

種別の評価を行ったところ、浸潤しているのは主に肺胞マクロファージ (Figure 3B) と好中球 (Figure 3C) が浸潤していた。興味深いことに、HbV投与群ではこれら炎症性細胞の浸潤は抑制されていなかったのに対して、CO-HbV群は、そ

これらの浸潤を抑制していた (Figure 3)。

2-2. 肺線維化の評価

次に、肺線維化の評価を、マッソントリクローム染色と、ヒドロキシプロリンの定量により行った。マッソントリクローム染色の結果、生理食塩水投与群及びHbV投与群において明らかな見られた顕著な線維化の進行が見られたのに対し、CO-HbV投与群では、その進行が抑制が確認されていた (Figure 4A)。また、ヒドロキシプロリンを定量した結果、マッソントリクローム染色の結果と同様に、生理食塩水投与群及びHbV投与群においては有意な産生の増加が確認されたのに対して、CO-HbV投与群においてその抑制が確認された (Figure 4B)。以上の結果より、線維化の抑制効果がCOに起因していると推定された。

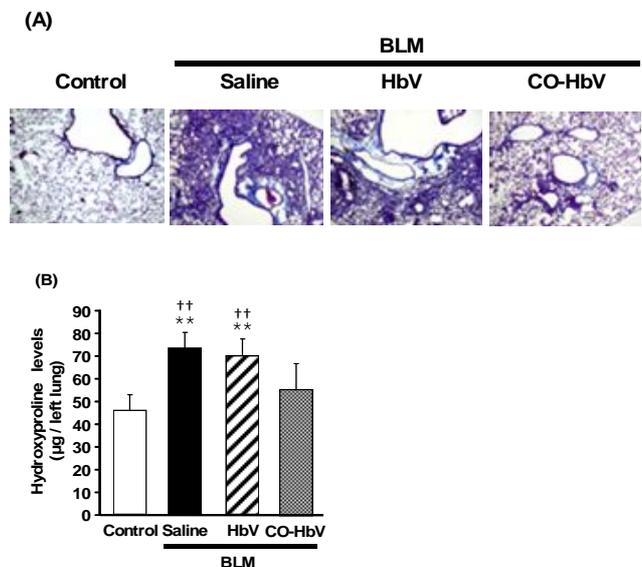


Figure 4

(A) Histopathologic evaluation at after saline, HbV or CO-HbV treatment on day 14 in BLM-induced pulmonary fibrosis mice.

Sections of pulmonary tissue were prepared on day 14 and subjected to Masson trichrome staining.

(B) Hydroxyproline levels in left lung at after saline, HbV or CO-HbV treatment on day 14 in BLM-induced pulmonary fibrosis mice.

The pulmonary hydroxyproline level was done on day 14. Each value represents the mean \pm s.d. ($n=3-7$). ** $P<0.01$ versus control. †† $P<0.01$ versus CO-HbV.

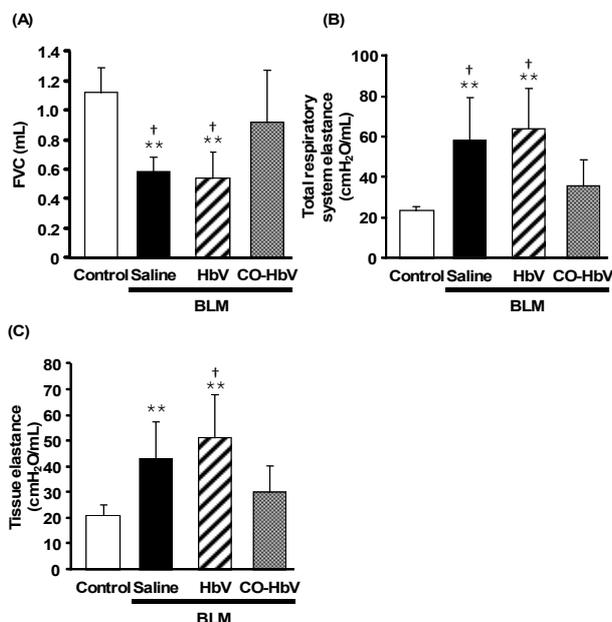


Figure 5 The lung mechanics and respiratory functions after saline, HbV or CO-HbV treatment on day 14 in BLM-induced pulmonary fibrosis mice. Forced vital capacity (A), total respiratory system elastance (B) and tissue elastance (C) were determined on day 14. Each value represents the mean \pm s.d. (n=4-5). **P<0.01 versus control. †P<0.01 versus CO-HbV. ††P<0.05 versus CO-HbV.

2-3. 肺機能評価

最後に、CO-HbV投与による肺機能への効果について評価を行った。評価項目としては、肺線維症をはじめとする拘束性障害でその値が低下することからIPF患者に対する治療効果の指標として用いられている努力肺活量 (FVC) により評価を行った。その結果、生理食塩水投与群及びHbV投与群では線維化に伴うFVCの低下が認められるのに対し、CO-HbV投与群では、その抑制が確認された (Figure 5A)。また、肺全体及び肺胞の硬さを測定した結果、FVCと同様にCO-HbV投与群では、肺機能悪化の抑制が確認された (Figure 5B and C)。したがって、CO-HbV投与によりIPFに対する治療効果が認められた。

D . 結論

本研究結果のみでHbVが高脂血症時に安全であると断定することはできないが、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) しても生体蓄積性は殆ど無く、少なくとも体内動態学的観点では安全であると考えられる。今後、血液学的評価や組織学的評価を含めた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) における詳細な安全性を明らかにしていけると考えられる。これらの検討項目については、次年度に行っていく予定である。

加えて、本研究ではCO-HbVがIPFに対して有効性を示した。IPFは、原因不明の肺線維症であり、慢性かつ進行性の経過をたどり、最終的には呼吸不全を来し死に至る予後不良な難治疾患であり、生存期間の中央値は2.8年であり、5年生存率はわずか20%と非常に低いことが報告されている。臨床現場では、治療薬としてステロイドや免疫抑制剤、さらには抗線維化剤であるピルフェニドンが使用されているが、その効果は不十分であり、より有効な治療薬の開発が切望されている。本研究結果より、CO-HbVは、IPFの新規治療薬として有用であり、新規治療薬候補として有望ではないかと考えられる。

以上より、HbVのApoE欠損マウスを用いた体内動態実験より、HbVは高脂血症時においても生体蓄積性は少ないことが示唆された。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、COは抗炎症作用、抗酸化作用などの多くの生理機能を有しており、HbVは、COの有用なキャリアとなりうることから、CO-HbVはIPFの新規治療薬としてだけでなく、炎症や活性酸素が関連する多くの疾患の治療薬候補として有望ではないかと考えられる。来年度以降にCO-HbVの更なる可能性について追及していこうと考えている。

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の安全性かつ有用であるばかりでなく、COキャリアとしてHbVが様々な疾患に対し

ても安全に使用できることを示しており、HbV は多くの疾患治療薬として期待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. Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, Kodama A, Nagao S, Watanabe H, T G Chuang V, Otagiri M, Maruyama T. Albumin fusion prolongs the antioxidant and anti-inflammatory activities of thioredoxin in mice with acetaminophen-induced hepatitis. *Mol Pharm.* (2014) *in press*
2. 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.
3. Ishima Y, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Otagiri M. Poly-s-nitrosated albumin as a safe and effective multifunctional antitumor agent: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Biomed Res Int.* (2013) 353892.
4. 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.
5. 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.
6. Chuang VT, Otagiri M. Photoaffinity labeling of plasma proteins. *Molecules.* (2013) 18(11): 13831-59.
7. Taguchi K, Jono H, Kugimiya-Taguchi T, Nagao S, Su Y, Yamasaki K, Mizuguchi M, Maruyama T, Ando Y, Otagiri M. Effect of albumin on transthyretin and amyloidogenic transthyretin Val30Met disposition and tissue deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. *Life Sci.* (2013) 93(25-26):1017-22.
8. Watanabe H, Sakaguchi Y, Sugimoto R, Kaneko KI, Iwata H, Kotani S, Nakajima M, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p-cresyl sulfate, a uremic toxin. *Clin Exp Nephrol.* (2013) *in press*
9. Taguchi K, Ujihira H, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T. Pharmacokinetic study of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model. *J Pharm Sci.* (2013) 102(10):3852-9.

10. Nishijima M, Kato H, Fukuhara G, Yang C, Mori T, Maruyama T, Otagiri M, Inoue Y. Photochirogenesis with mutant human serum albumins: enantiodifferentiating photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate. *Chem Commun.* (2013) 49(67):7433-5.
11. Altaf A, Aldawsari H, Banjar MZ, Anraku M, Iohara D, Otagiri M, Uekama K, Hirayama F. Preparation of soluble stable C₆₀/human serum albumin nanoparticles via cyclodextrin complexation and their reactive oxygen production characteristics. *Life Sci.* (2013) 93(7):277-82.
12. Taguchi K, Ujihira H, Ogaki S, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Okamura Y, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T. Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41(8):1584-91.
13. Yamasaki K, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(12):5435-43.
14. Anraku M, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(12):5465-72.
15. Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka K, Mizushima T, Otagiri M, Maruyama T. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther.* (2013) 345(2):271-83.
16. Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, Otagiri M, Maruyama T. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin. *Nitric Oxide.* (2013) 30:36-42.
17. Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, Otagiri M. Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(4):2917-23.
18. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int.* (2013) 83(4):582-92.
19. Nishi K, Kobayashi M, Nishii R, Shikano N, Takamura N, Kuga N, Yamasaki K, Nagamachi S, Tamura S, Otagiri M, Kawai K. Pharmacokinetic alteration of (99m)Tc-MAG3 using serum protein binding displacement method. *Nucl Med Biol.* (2013) 40(3):366-70.
20. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. A human serum albumin-thioredoxin

fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. *Kidney Int.* (2013) 83(3):446-54.

21. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome P450 impairment in hemorrhagic-shock rats. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41(1):141-8.

22. S. Nagao, K. Taguchi, H. Sakai, R. Tanaka, H. Horinouchi, H. Watanabe, K. Kobayashi, M. Otagiri, T. Maruyama. Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles as a potential therapeutic agent for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials* (in press)

2. 主な学会発表

1. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. Kaori Watanabe, Yu Ishima, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, Masaki Otagiri, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

2. Therapeutic impact of human serum albumin-thioredoxin fusion protein, long-acting anti-oxidative and anti-inflammatory modulator, against acetaminophen-induced acute liver failure. Ryota Tanaka, Hitoshi Maeda, Azusa Kodama, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Toru Maruyama, Masaki Otagiri (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

3. Carbon monoxide bound red blood cells protect the expression of hepatic cytochrome P450 after

resuscitation from hemorrhagic shock via inactivation of Kupffer cells. Shigeru Ogaki, Kazuaki Taguchi, Hitoshi Maeda, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

4. Mechanism of enhanced cysteinylolation of Cys34 in human serum albumin in chronic liver disease. Kohei Nagumo, Tadashi Imafuku, Naoyuki Yamada, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Motohiko Tanaka, Yutaka Sasaki, Masaki Otagiri, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

5. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. Hiroshi Watanabe, Azusa Kodama, Ryota Tanaka, Hisae Tanaka, Victor Tuan Giam Chuang, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

6. Safety and pharmacokinetic evaluation after a massive intravenous infusion of hemoglobin-encapsulated liposome (Hemoglobin-vesicles) in cynomolgus monkeys. Kazuaki Taguchi, Hiroshi Watanabe, Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Koichi Kobayashi, Toru Maruyama, Masaki Otagiri (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

7. Preclinical studies of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier in non-human primate. Kazuaki Taguchi, Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Koichi Kobayashi, Toru Maruyama, Masaki Otagiri (The XIVth

International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Chengdu, China, 2013/10/18-21)

8. Artificial red cells (hemoglobin-Vesicles) for blood substitutes and oxygen therapeutics. Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Horoshi Azuma, Masaki Otagiri, Koichi Kobayashi (The XIVth International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Chengdu, China, 2013/10/18-21)

9. Albumin -Thioredoxin Fusion Protein is Effective in Suppressing Lung Injury. Masaki Otagiri (9th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, Orlando, 2013/5/12-15)

10. Development of recombinant serum albumin. Masaki Otagiri (The International Liver Congress 2013 48th annual meeting of the European association for the study of the liver, Amsterdam, the Netherlands, 2013/4/24-28)

11. 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、大柿滋、氏平隼人、田口和明、渡邊博志、藤山淳史、土井麻美、池田康夫、武岡真司、半田誠、小田切優樹、丸山徹 (第 20 回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

12. 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、永尾紗理、丸山徹、小田切優樹 (第 20 回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

13. 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、大柿滋、田口和明、前田仁志、異島優、渡邊博志、小田切優樹 (第 20 回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

14. 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 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 (第 20 回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

15. クッパー細胞選択的チオール送達によるアセトアミノフェン肝障害治療法の開発 前田仁志、平田憲史郎、渡邊博志、異島優、末永綾香、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

16. アルブミン-チオレドキシシン融合体によるスプラチン腎症予防効果 小玉あずさ、田中遼大、渡邊博志、異島優、深川雅史、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

17. 高分子抗癌剤の腫瘍集積性を高める S-ニトロソ化アルブミンダイマーの EPR 効果増強作用 異島優、方軍、前田浩、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

18. クルクミンと血清アルブミンの相互作用と抗酸化活性への影響 佐藤弘樹、異島優、渡邊博志、山崎啓之、安楽誠、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

19. インフルエンザ肺障害に対するニューキノロン系抗菌薬の有効性評価 榎木裕紀、田中遼大、宮本洋平、異島優、渡邊博志、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

臓学会学術総会, 東京, 2013/5/10-5/12)

20. 骨髄標的化エリスロポエチンの製剤設計と腎性貧血治療への応用 丸山徹、宮崎裕理、田口和明、渡邊博志、宗慶太郎、田中元子、松下和孝、深川雅史、小田切優樹 (第56回日本腎

G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
該当無し。

**分担課題：1)ヘモグロビン小胞体(HbV)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(HbV)投与後の
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**

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
	酒井 宏水	奈良県立医科大学化学教室 教授

研究要旨

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、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。しかし、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は、不明のままであった。本研究では、そのことを明らかにするため、反応系におけるサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。その結果、リポソームを投与すると産生が増加するものとして、主としてマクロファージが産生する、CC-chemokine, IL-10, TNF- α およびTh1サイトカインであるIFN- γ , IL-2が明らかになった。一方、リポソームの投与の有無に関わらず産生誘導が認められないものとしてIL-1, IL-18, Th2 cytokineであるIL-4, 5, 13が明らかになった。また、空リポソームを貪食したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをコントロールマクロファージと比較し、貪食後に発現の増強を認める遺伝子群を同定した。

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見出している。しかし、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は、詳細な検討がなされてこなかった。本研究は、この点を明らかにすることを目的としている。さらに、リポソームを貪食した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、マクロファージの機能変化を分子生物学的側面から解析することを目的とした。

B. 研究方法

B1. 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6g/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脾細胞とした。

B2. 培養上清中にサイトカイン・ケモカインの測定

培養開始後、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。測定は、Bioplex pro rat cytokine assay panelを用いて、網羅的に測定した。即ち、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IFN- γ 、IL-10、IL-13、IL-17、IL-18、MCP-1 (CCL2)、MIP-1 α (XXA3)、MIP-3 (CCL19)、RANTES (CCL5)、TNF- α 、の16種類である。実験は異なる日に3回行った。1回目の実験で、培養72時間まで経時的に測定を試みた。2回目、3回目の実験では、その結果を踏まえて培養開始72時間後の培養上清中のサイトカイン・ケモカインを測定した。測定はすべてtriplicateで行なった。

B3. 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。

B4. 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。

B5. CFSE法によるCon A刺激に対するラット脾T細胞の増殖反応抑制の確認

B1で得られた脾細胞を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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 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比較し、コントロールと比較してあきらかに分裂回数の抑制がみられるのを確認した。また、一部の実験は、CFSEを使用する代わりに、増殖の状態を位相差顕微鏡による目視でも確認した。

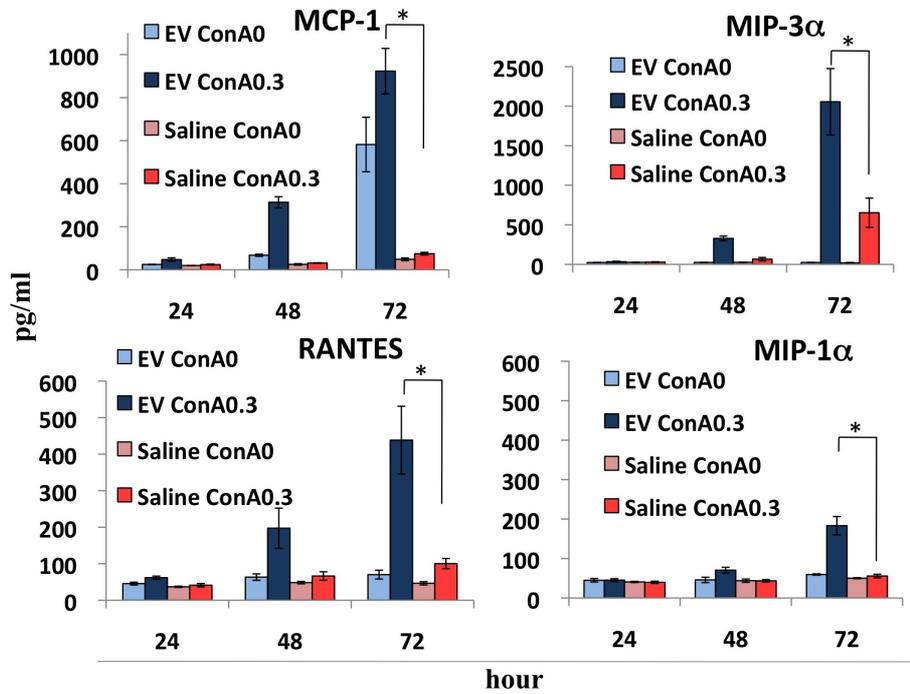


Fig 1. Production of Chemokines
Splenocytes were cultured in the presence of Con A (0.3μg/ml). The chemokine shown here increased in concentration in the culture supernatant of empty vesicle-loaded splenocytes (EV). (* : P<0.05)

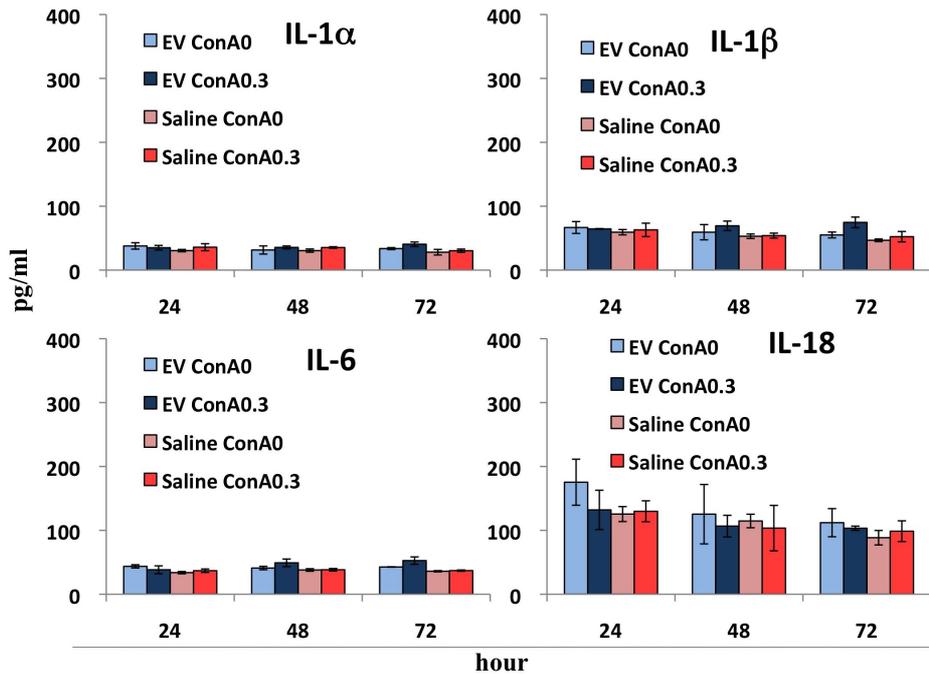


Fig 2. Production of cytokine
All the chemokine shown here did not change or increase in concentration in the culture supernatant.

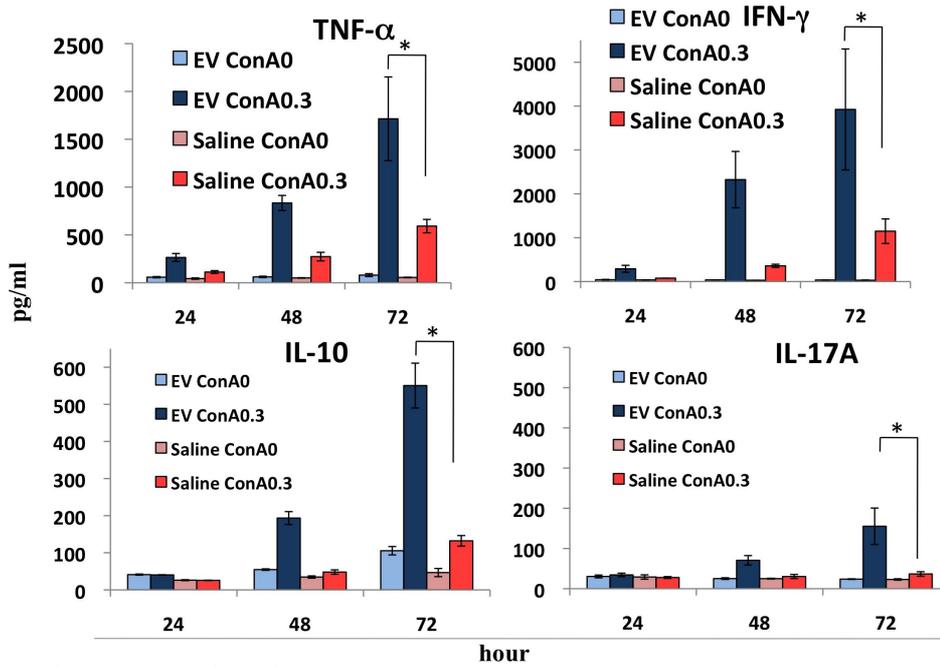


Fig 3. Production of cytokine

The cytokine shown here increased in concentration in the culture supernatant of empty vesicle-loaded splenocytes. (* : P<0.05)

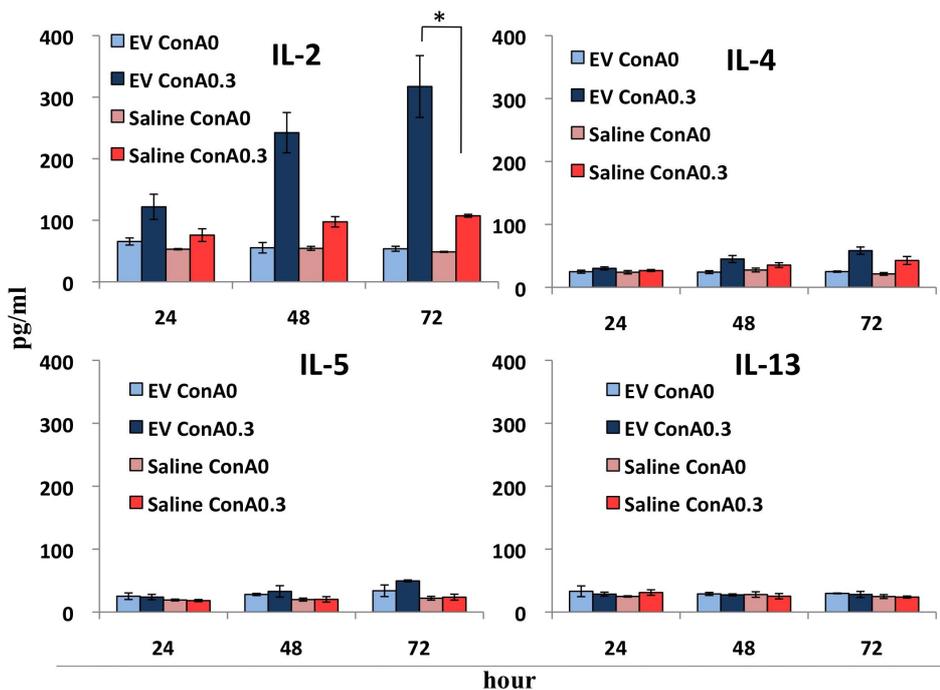


Fig 4. Production of Cytokine

Among these four chemokines, only IL2 increased in concentration in the culture supernatant of empty vesicle-loaded splenocytes than in saline-loaded splenocytes. IL4, 5 and 13 were shown not to increased at all. (* : P<0.05)

C . 研究結果

C. 1 培養上清中に分泌されるケモカイン・サイトカインの動態

サイトカイン・ケモカインの濃度を経時的に測定した1回目の実験から、あらかじめリポソームを投与した脾細胞からの分泌が、生理食塩水のみを投与した脾細胞からの分泌を上回るものと、経時変化を認めないものに分かれた。主としてマクロファージから産生されるケモカインである、MCP-1, MIP-1, RANTESそしてMIP-3は、コントロール(生理食塩水投与脾細胞)と比較して、リポソームを投与した脾細胞ではConA刺激後72時間まで経時的に産生されていることがわかった(72時間の時点で $P < 0.05$)(Fig. 1)。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, IL-2, IL-6, IL-18も、経時変化を認めなかった(Fig. 2)。同様の傾向は、TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-2においても認められた(Fig. 3, 4)。一方、IL-2, IL-17Aと同じく、T細胞由来のIL-4, IL-5, IL-13は、経時的な変化を認めなかった(Fig. 4)。一回目の実験の経時変化を踏まえ、実験2、3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の培養72時間と同様の結果を得た。

C. 2 遺伝子プロファイルの解析結果

リポソーム貪食後の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、特にFold increaseが高く、かつ免疫応答に関係すると推定される数個の遺伝子についての結果を表にした(表1)。

D . 考察

D. 1 リポソーム投与のサイトカイン・ケモカイン産生動態への影響

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

表1. 遺伝子プロファイルの解析結果

	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

は認められることを報告している。今回は、その時のケモカイン・サイト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樣に亢進していると思われる(Fig.1)。これらのケモカインが主としてマクロファージから産生される。従って、リポソームを貪食したことによるマクロファージの機能変化を反映していると考えられる。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。IFN- γ は、T細胞からの分泌が主と考えられているが、一部の樹状細胞はIFN- γ を産生するpotentialを持つことが知られており、観察されたIFN- γ の産生増強もリポソームを貪食したマクロファージからのものである可能性がある。この事は今後の検討が必要である。

一方、IL-1, IL-2, IL-6, 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, IL-2は、同じくマクロファージから産生されるCC chemokineと異なり、分泌の亢進は観察されなかった。これは、産生経路が異なることが原因であると思われる。また、IL-6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、自然免疫系の活性化は、リポソームの投与の有無に関わらず、起こっていないと判断される。今後は、自然免疫系を直接刺激する事により、リポソームの自然免疫系の反応に与える影響を検討する必要がある。

T細胞由来のサイトカインIL-2, IL-17Aはリポソ

ーム投与で産生が増強されるように見える。しかしながら、IL2はT細胞の増殖に必須であることから、リポソーム投与により、T細胞の増殖に抑制のかかった状態では、その消費が抑制されており、その結果コントロールと大きな差となって観察されている可能性がある。その一方でIL-4,-5,-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 2, 3)。これらの結果は、リポソーム投与により、少なくともIL2産生の抑制はなく、かつTh2サイトカインの産生増強もないと想定される。

D. 2 リポソーム貪食後の遺伝子発現プロファイルについて

ApoEメッセージの増加は、貪食したリポソームの構成成分である脂質を代謝する為には、必須の反応であると考えられる。ApoEメッセージの増強が観察されたことから、回収した細胞群が、目的の細胞を十分に含んでいたことを示しているものと考えられる。Mmp14とCcl9はいずれの実験でも非常に強い発現の増強を認めたが、その意義については不明である。CCL9は主にマクロファージから産生され、その受容体がCCR1である。実験結果から、リポソーム貪食細胞が、CCR9を産生し、CCR1を発現している細胞を集積する作用を発揮する事が推測できる。

IL-1 は主としてマクロファージから産生されるものであり、リポソーム投与後のDR-, CD11b/c + 細胞群で遺伝子発現の増強を認めていることが示されたが、IL-1 のメッセージの増強は認めなかった。IL-18bpもマクロファージから産生され、IL18と結合することにより、IL18のIFN- の産生増強効果を減弱する作用を有する。この事が、T細胞増殖抑制にどのように関与しているのかは、不明である。いずれにしても、CCL9, IL-1 , IL-18bpはマクロファージの産生する物質であり、我々の実験系におけるimmuno suppressive macrophageを特徴的づける遺伝子発現パターンを示しているものと思われる。

CD276は、B7-H3分子と同じものであり、免疫応答の制御に関わる分子である。その機能に関しては、T細胞機能を促進するという報告と抑制するという報告の相反する2つの報告がある。我々の系においては、B7-H3がT細胞の増殖を抑制する事に関与している可能性があるため、今後B7-H3の役割について、検討を進めて行きたいと考えている。

E. 結論

ラットに空リポソーム溶液を循環血液量の20% (v/v)相当の量を投与した後に、脾臓を取り出し、Con A刺激を加えて培養し、サイトカイン・ケモカインの産生動態の変化を網羅的に観察した。ケモカイン・一部のT細胞由来サイトカイン、IL10, TNF-, IFN- の産生亢進が観察された。特に、主としてマクロファージ由来と考えられるケモカインの産生増強は、リポソームのマクロファージへの一過性の影響の一端を反映しているものと思われる。得られた結果は、リポソーム貪食マクロファージが、貪食後もその機能を保持していることも示している。また、リポソーム貪食マクロファージに特有な遺伝子プロファイルが示され、その中から、T細胞増殖抑制作用に関与する候補遺伝子と考えられるものが同定された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

(原著論文)

1. 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)

(総説)

1. 酒井宏水, 堀之内宏久, 東 寛, 小田切優樹, 小林紘一. 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)

(著書)

1. 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.385-397, 2013.

(学会発表)

1. 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

2. 東 寛 / 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 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013年12月6-7日
3. 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 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013年12月6-7日

H . 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

該当なし。

分担課題：ヘモグロビン小胞体(HbV)の出血性ショックにおける有用性に関する研究

分担研究者 高瀬 凡平 防衛医科大学校 附属病院 集中治療部・准教授
(臨床教育教授)

研究協力者 木下 学 防衛医科大学校・准教授

研究要旨

出血性ショックにより平均全身血圧が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されている。しかし、致死性不整脈の発生機序に関する検討は少ない。そこで、実験的に検討した。方法：SD rat (n=32) に30%出血性ショック状態を作成し、非蘇生群、洗浄赤血球(RBC)蘇生群、生理食塩水蘇生群、5%アルブミン蘇生群の4群間で心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na⁺ channel 感受性色素を用いたOptical mapping system (OMP)で興奮伝播・活動電位持続時間不均一性 (Action potential duration dispersion :APDd) 致死性不整脈性を検討した。また、心筋組織のconnexin 43 (Cx43)発現を免疫組織染色にて検討した。蘇生群では、3群とも全例蘇生に成功した。しかし、生理食塩水、5%アルブミン群ではOMPで著明な左心室伝導遅延とburst pacingによる心室細動が全例で誘発されたのに対し、RBC蘇生群では、伝導遅延・心室細動誘発ともに認められなかった。生理食塩水、5%アルブミン群では著明にAPDd値が増大したが、RBC群では正常に保たれていた。Cx43発現は生理食塩水、5%アルブミン群では異常が認められたものの、RBC群では正常に保たれていた。以上より、出血性ショック心臓では、左心室伝導遅延とAPDd増大及びCx43発現異常を惹起し、電気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。RBC治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。また、このモデルは、HbVの有効性を評価するのに適したものと考えられる。

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繁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性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3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催不整脈誘発性を検討するとともに、心筋組織の心筋興奮伝導蛋白であるconnexin43発現を免疫組織染色し、非蘇生群を対照群として、出血性ショック心の不整脈発生機序を検討することを本研究の目的とした。

B . 研究方法

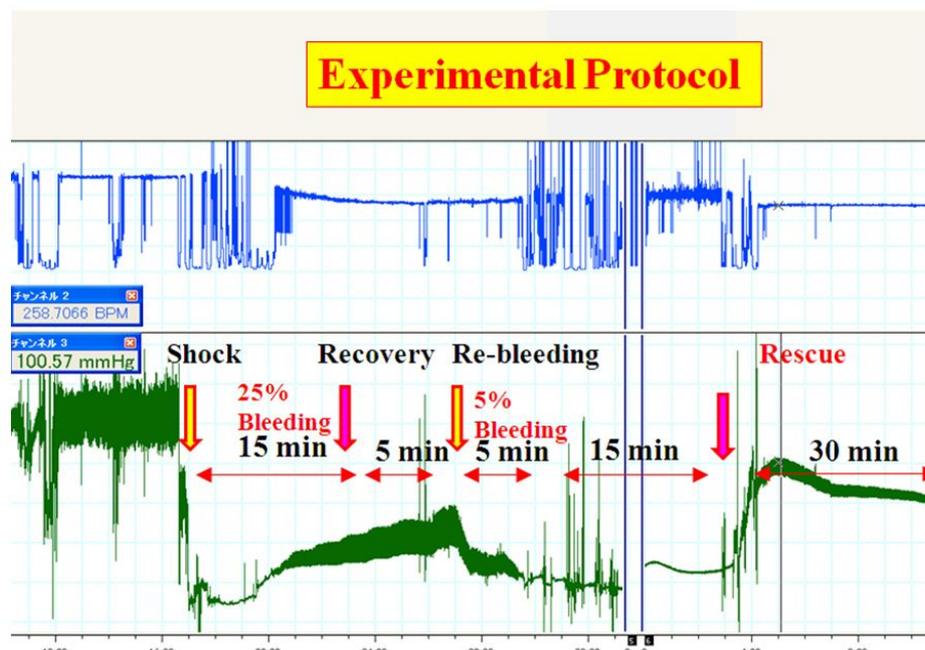
Sprague-Dawley rats (male; 8 weeks old; 250-300 g; n = 32)の皮下にketamine hydrochloride (5 mg/kg)を投与し麻酔した。麻酔下に気管内挿管し、人工呼吸下で、abdominal aorta catheter挿入、血圧測定するとともにabdominal aorta catheterから脱血し、以下のプロトコールで致死性出血性ショックモデルを作成した(図1)。すなわち、循環血液量25%を15分で脱血、5分間放置後再出血モデルとして、5%を5分かけて再脱血(Total 30% blood loss : 不可逆性Shock)を実施した。その後15分間放置したのち、脱

血量と同量 5%アルブミン(5%アルブミン群)、生理食塩水(生理食塩水群)及び洗浄赤血球(洗浄赤血球群)蘇生した。また、非蘇生群も対照群として作成した(各群、n=8)。

(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感受性蛍光色素(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

図1

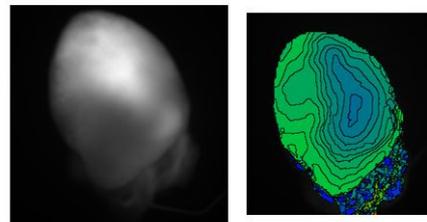


(APD)を commercialized software (Ultima-6006; Sei Media, Inc., Tokyo, Japan)にて解析した(図2)殊に、右心室心膜面の約5x5mmの関心部位(ほぼ右心室自由壁の中央)を任意に設定し、この部位におけるAPDの分布のヒストグラムと、APDの実波形を

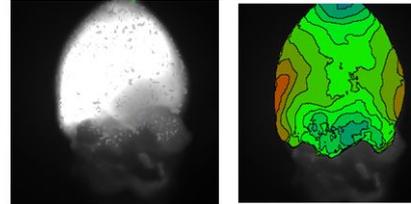
記録した。APDはAPD 60msを使用した。ヒストグラムより、最大APDと最小APDの差からAPD不均一性(APD dispersion [ms])を決定し、出血性ショック蘇生後摘出心臓における、経時的APD dispersion変化を比較した(図3)。

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)

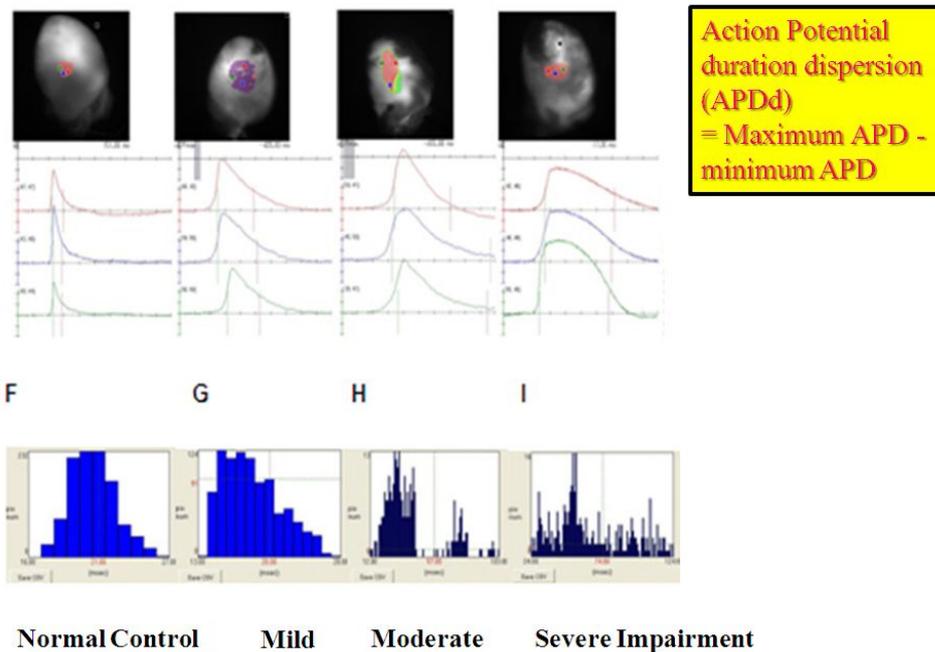
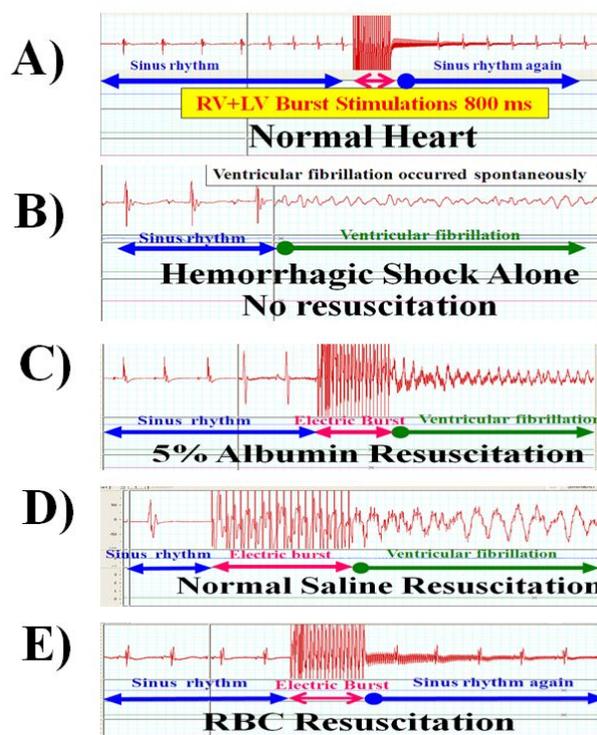


図4

Induction of Lethal Arrhythmias by Burst Stimulation to the Ventricles



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) Connexin43に関する免疫組織学的検討

摘出心臓を 4% paraformaldehyde phosphate buffer solution (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) にて48時間固定した。それぞれの標本は、70% ethanolにて脱水しparaffin固定した。組織学的検討では、心筋伝導蛋白であるconnexin43の心筋組織内発現の程度を定性的に評価するため、免疫組織染色を施行した。すなわち、Anti-connexin43 monoclonal antibody (1:2,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を用いて、心筋組織内の心筋 gap-junction 蛋白 connexin 43の発現を検討した。

(3) 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。興奮伝播様式及びconnexin43の発現様式は異常の有無を、異常有りま

たは無しとの定性的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を統計学的に有意とした。

C . 結果

(1) 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3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 ± 1 ms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 ± 3 ms

図5

Comparison of Activation Map

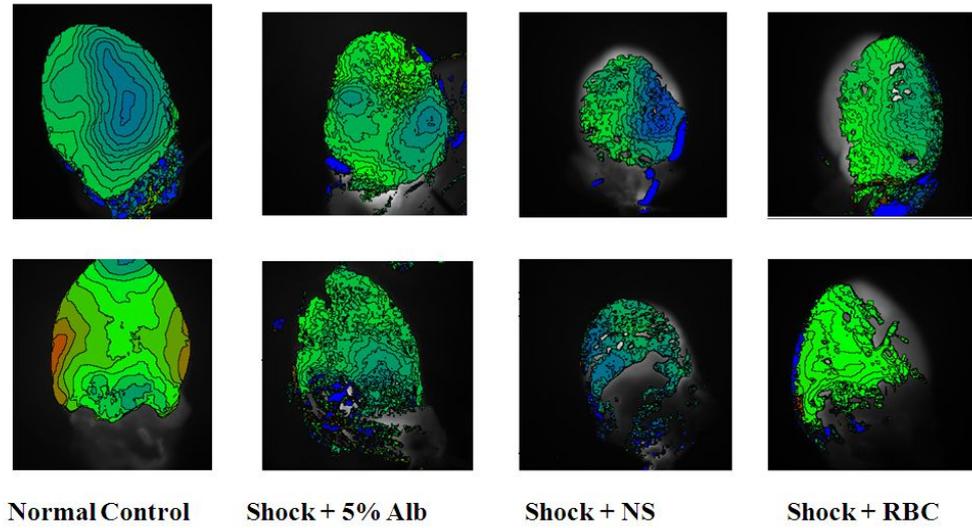
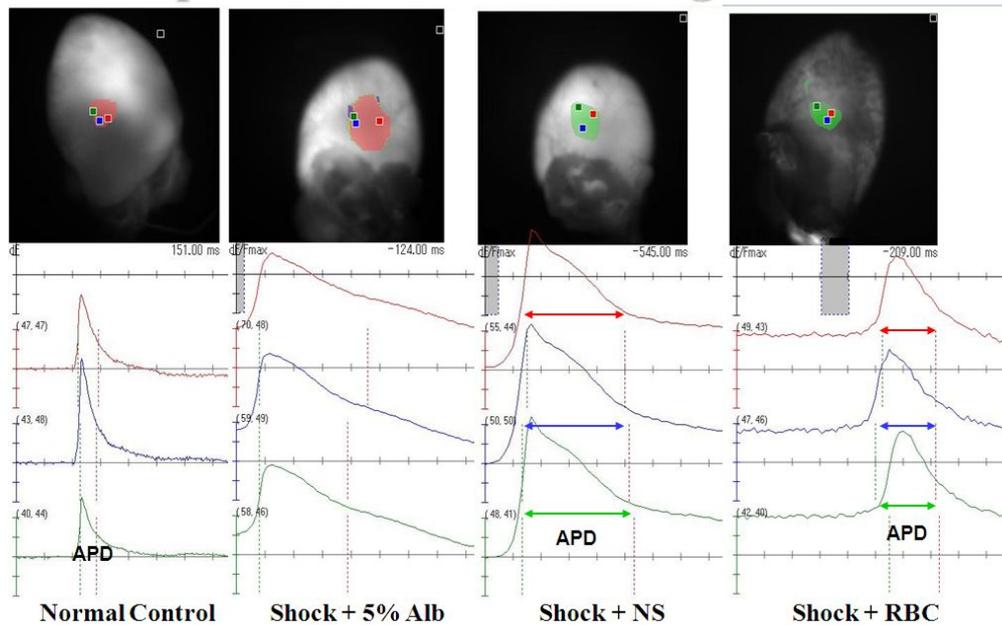


図6 Comparison of Action Potential Duration Dispersion after Hemorrhagic Shock



及び $39 \pm 3\text{ms}$ 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($22 \pm 3\text{ms}$)であり、かつ、正常伝播様式であることが認められた。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) なかったのに対し、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。また、活動電位持続時間そのものも正常Rats、洗浄赤血球群に比較し、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、洗浄赤血球群蘇生群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)。

(2) 心筋におけるconnexin43の発現(免疫組織学的検討)

左心室におけるconnexin43の発現を免疫組織学的に検討した。図7に示した如く、視覚的定性的にconnexin43発現量・発現様式の異常の有無を検討した。その結果、正常Rats左心室心筋におけるconnexin43の正常発現量・発現様式に比較し、5%アルブミン群及び生理食塩水群では明らかにconnexin43の発現量・発現様式は異常であり、洗浄

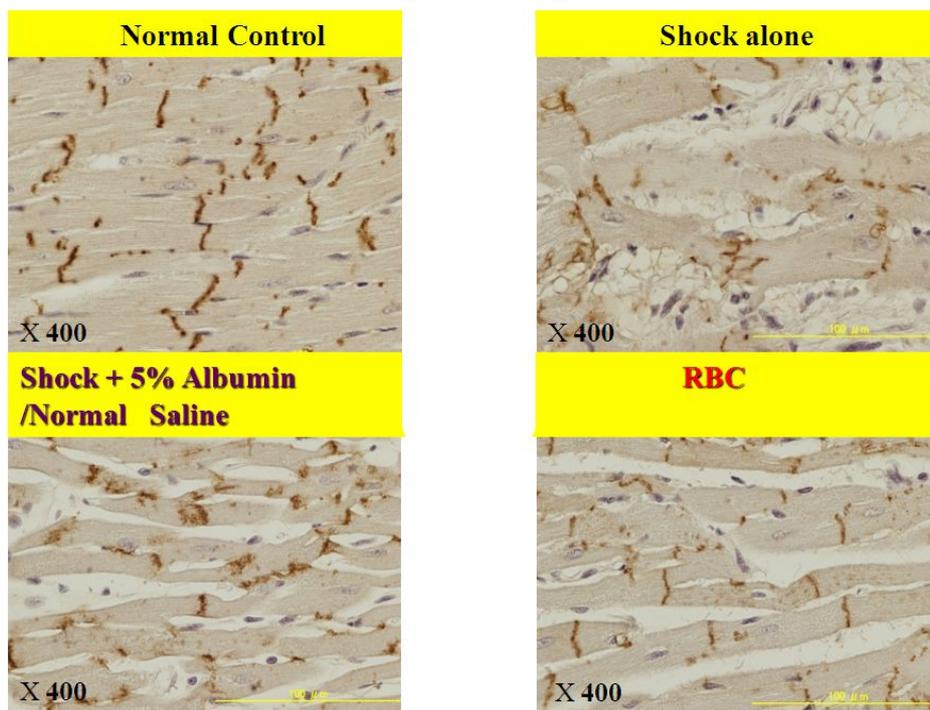
赤血球群では正常に保たれていた。

D. 考察

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・心筋Gap junctionの伝導蛋白connexin43等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

図7 Findings of Immunohistochemistry
Connexin43: Gap junction protein in the LV



不均一性を示すAPD dispersion増加が認められ、かつ、不整脈の発生機序に係る心筋Gap junctionの伝導蛋白connexin43の発現低下が認められるとともに、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。

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。洗浄赤血球治療群で、致死性不整脈やその病因となるOptical mapping system解析指標、心筋Gap junctionの伝導蛋白connexin43の発現が保たれた。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。

E . 結論

出血性ショック心臓では、左心室伝導遅延とAPDd増大及びCx43発現異常を惹起し、電気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。RBC治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。このモデルは、HbVの有効性を評価するのに適したものと考えられる。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究業績

(原著論文)

1. Tanaka Y, Takase B, Yao T, Ishihara M. Right ventricular electrical remodeling and arrhythmogenic substrate in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;49:426-36.
2. 高瀬凡平、東村悠子、木村一生、田中良弘、服部秀美、石原雅之. 出血性ショック心臓における致死性不整脈の機序に関する実験的検討. *Therapeutic Research* 2013;34:1060- 1066.

(学会発表)

1. Takase B, Tanaka Y. Myocardial Electrical Remodeling and Arrhythmogenic Substrate in Hemorrhagic Shock-Induced Heart. (American Heart Association Annual Scientific Session 2013, Dallas US A 2013/11/15-20)
2. Takase B, Tanaka Y, Ishihara M. Pressure overload causes right ventricular lethal arrhythmias: analysis by optical mapping in pulmonary artery banding and pneumonectomy model. (American Heart Association Annual Scientific Session 2013, Dallas US A 2013/11/15-20)
3. Takase B, Tanaka Y, Higshimura Y, Hattori H, Ishihara M. Significant role of action potential duration dispersion and connexin 43 in lethal arrhythmogenesis in hemorrhagic shock heart. (第28回日本不整脈学会学術大会, Tokyo 2013/7/4-6)
4. 高瀬凡平、東村悠子、田中良弘、木下 学. 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. 第20回日本血液代替物学会年次大会. 奈良県新公会堂. 2013年12月6-7日.

H . 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
該当なし。

別添 5

表 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
Primary and secondary immune responses to keyhole limpet hemocyanin in rats after the infusion of hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier. <i>Artif. Organs</i> 38, 234-238 (2014)	2014年3月	Wiley	M. Fujihara, D. Takahashi, H. Abe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, H. Ikeda, H. Azuma
Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles as a potential therapeutic agent for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. <i>Biomaterials</i>	In press	Elsevier	S. Nagao, K. Taguchi, H. Sakai, R. Tanaka, H. Horinouchi, H. Watanabe, K. Kobayashi, M. Otagiri, T. Maruyama.
出血性ショック心臓における致死性不整脈の機序に関する実験的検討. <i>Therapeutic Research</i> 2013;34:1060- 1066.	2013年8月	ライフサイエンス出版	高瀬凡平、東村悠子、木村一生、田中良弘、服部秀美、石原雅之
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. <i>人工血液</i> 21, 36-48 (2013)	2013年11月	日本血液代替物学会	酒井宏水、堀之内宏久、東 寛、小田切優樹、小林紘一
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)	2013年	World Scientific, Singapore	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)	2013年12月	Springer-Verlag	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)	2013年12月	Springer-Verlag	H. Azuma, M. Fujihara, 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)	2013年12月	Springer-Verlag	T. Ikeda, H. Horinouchi, Y. Izumi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
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)	2013年12月	Springer-Verlag	H.W. Kim, J.S. Jahr, A. Mozzarelli, H. Sakai
人工赤血球の開発状況と将来展望. <i>Anesthesia Network</i> 18, 37-41 (2014)	2014年1月	下野印刷	酒井宏水
工赤血球による生体組織への酸素輸送. 「全人力・科学力・透析力に基づく透析医学」平方秀樹 監修	印刷中	医薬ジャーナル社	酒井宏水

特許出願

PCT/JP2012/59233 (2012年4月4日出願): 小胞体の製造法.
(2013年度に国内段階移行完了: 米国, インド, 中国, EP, 日本)

報道

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

その他

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-7日
会 場:奈良県新公会堂
大会長:酒井 宏水(奈良県立医科大学医学部化学教室)