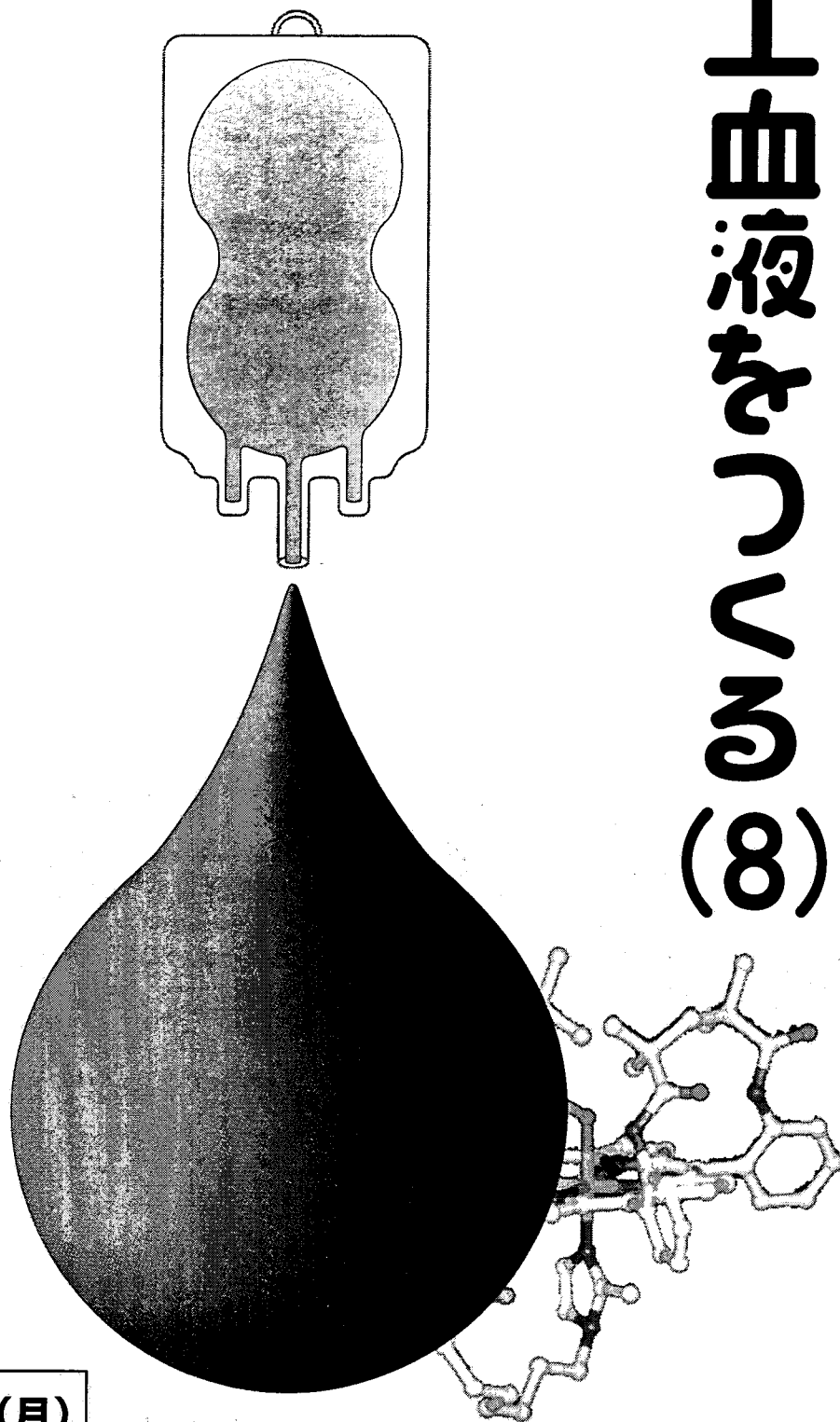


平成19年度厚生労働省科学研究費補助金政策創薬総合研究推進事業

平成19年度発表会

人工血液をつくる (8)



平成20年2月11日(月)

時間: 13:30~16:45

慶應義塾大学信濃町キャンパス、
北里講堂(北里記念図書館内)

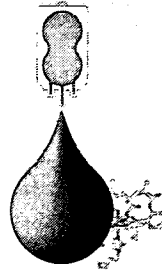
定員: 250名

主催: 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

厚生労働省科学研究班

小林 紘一、四津 良平、半田 誠

後援: 日本血液代替物学会



ご挨拶

人工血液をつくるということ

このたびは厚生労働省科学研究・政策創薬総合研究事業の平成19年度研究成果発表会「人工血液をつくる(8)」にご参加いただきましてありがとうございます。

血液は人体の中で、酸素や栄養素を末梢組織、臓器へ運搬し、末梢の組織、臓器で代謝され、不要となった物質を回収するために重要な役割を果たしています。血液中には白血球、赤血球、血小板といった血球成分が存在し、それぞれ酸素運搬、生体防御、止血機構の役割を担っています。

外傷や手術などで血液が失われたり、いろいろな疾患で貧血が進んだりすると、末梢組織での酸素不足や、血圧の低下などが起こり、各種臓器が正常に機能しない状態となることがあります。出血が中等量以上となると、自分の力で血液の状態を元へ戻すことは難しくなるので、血液の補充(輸血)を行うことによって出血や貧血の治療を行うと同時に各種臓器の機能も保護しています。

輸血という治療法が医療に応用されるようになってから100年以上が経過しました。この1世紀の間の科学の進歩により輸血は安全な治療法に生まれ変わってきました。特に血液を介する感染症の危険性は日本ではほとんどなくなってきているといえます。

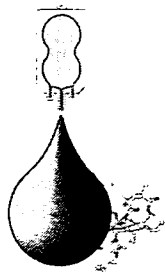
輸血による治療は国民の皆様の献血という尊い行為によって支えられていますが、少子高齢化が進むと輸血の需要を満たすことが難しい状況が起こる可能性が指摘されています。また、未知の感染症が明らかになったときに供給が減少する可能性も示唆されています。さらに、大震災などの災害における医療の供給という面においても輸血供給システムの更なる整備が必要です。

このような状況下で、長期に保存が可能で、血液型にかかわらず使用できる人工血液があれば、輸血による治療を補完する安全策として機能するのではないかと考えられています。また、船舶内や、飛行機の中で、ひょっとすると宇宙船の中で血液が必要とされるときに使用されることを予想しています。このような人工血液は現在酸素を運搬する人工赤血球と止血機構の重要な役割を果たす人工血小板について研究が進められています。

本日は4人の先生方から人工赤血球と人工血小板についての最新の研究成果の最先端と今後についてご発表いただきますが、血液の機能、人工血液の必要性、開発状況などについてご理解を深めていただけると幸いです。

平成20年2月11日

慶應義塾大学 医学部 外科 教授
小林 紘一



発表概要と演者紹介

1 人工赤血球の臨床応用に当たっての問題点と対策・開発現況

慶應義塾大学 医学部 外科 教授 小林 統一

私たちは早稲田大学理工学術院の先生方と共同で人工赤血球「ヘモグロビン小胞体」を開発しています。ヘモグロビン小胞体は期限切れとなつてしまい、使用されることのない献血血液から酸素結合たんぱく質であるヘモグロビンを高純度に分離、精製し、さらに未知のウイルスが存在することを想定したウイルス不活化処理を行った後に油の膜で包み、粒径を250ナノメートル（4000分の1mm）に調整した物質です。種々の改良により室温での長期保存が可能で、十分な酸素運搬能力を持ち、生体適合性に優れた物質となりました。現在は人に投与できる製剤を目指して研究が進んでいます。本日はヘモグロビン小胞体の開発の現状と臨床応用までの道のりについてお話したいと思います。



こばやし こういち、慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授、慶大医（昭42）、医学博士
〒160-8582 新宿区信濃町35 kobayash@sc.itc.keio.ac.jp

【人工血液に対する思い】 人工赤血球は臨床応用に進める段階にきています。新たな発展を期待しています。

2 救急災害医療に対応できる人工赤血球の開発、ショックにおける投与の安全性、虚血モデルでの研究成果

慶應義塾大学 医学部 外科 准教授 堀之内 宏久

私たちは主として早稲田大学理工学術院と慶應義塾大学医学部の共同研究で作られた人工赤血球を用いて救急医療にどのような適応があるかについて探索的な研究を行っています。とくに急性出血のときの蘇生液、心臓血管外科手術時の体外循環補填液、脳虚血時の酸素の供給法として使用できるのではないかと考えています。人工血液には輸血にない性質があり、この特徴を用いて新しい治療分野が生まれるのではないかと考えて研究を続けています。



ほりのうち ひろひさ、慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 准教授、慶大医（昭57）、医学博士
〒160-8582 新宿区信濃町35 horinouc@sc.itc.keio.ac.jp

【人工血液に対する思い】 人工赤血球は小さい、酸素以外のガスも運搬できるなどの特徴があり、新たな治療法の開発が可能ではないかと考え、研究を続けています。

3 物質としての人工赤血球の特徴

早稲田大学 理工学研究所 准教授 酒井 宏水
早稲田大学 理工学研究所 名誉教授 土田 英俊

酸素を結合する蛋白質(ヘモグロビン: Hb)の高純度溶液を、濃度高くリン脂質小胞体に内包した微粒子(Hb小胞体)が、新しい人工酸素運搬体として注目されています。血液型が無く、感染源を含まず、長期間(2年以上)の備蓄ができ、現行の輸血を補完する輸血代替としての効能と安全性が明らかにされており、一刻も早い臨床試験が待たれています。更に、Hb小胞体の利点を活用し、臓器移植や組織再生など、新しい治療法への応用展開も期待されています。現在では期限切れ献血液の有効利用の観点からヒト由来Hbを原料としていますが、将来的には遺伝子組換え技術により産生するリコンビナントHbを用い完全人工型として、安全性と経済性と優先すべきで、国際的貢献も可能です。行政に一石を投げ、国策として、また血液事業の一環として、より一層研究開発を促進し、国民の健康福祉の向上のために役立たせるべきと考えます。



さかい ひろみ、早稲田大学 理工学研究所 准教授 酸素輸液プロジェクト、早大理工(平6)、工学博士、医学博士
つちだ えいしゅん、早稲田大学 理工学研究所 名誉教授 酸素輸液プロジェクト、早大理工(昭38)、工学博士
〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 hiromi@waseda.jp, eishun@waseda.jp

【人工血液に対する思い】 実に精巧に出来ている本物の赤血球に学び、これを超越る?人工の赤血球の実現を目指します。

4 臨床応用可能な人工血小板の性能と安全性の評価

慶応義塾大学 医学部 輸血・細胞療法部 准教授 半田 誠

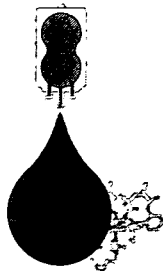
血小板は止血機構の主役です。血液中の血小板が高度に減少すると、自然に出血したり止血が困難となったりして、生命の危険に曝されます。それを予防・治療する目的に血小板輸血が使われます。しかし、献血された血小板は数に限りがあり、保存期間も短く、ウイルス感染などの副作用があり、血小板の止血機能を代替する人工物の創製が求められています。

我々は10年余の研究により動物モデルで有効な止血機能を示すプロトタイプ的人工微粒子を開発することに成功しました。依然として困難な道のりが続いています。人工微粒子の性能や安全性についての現状を紹介し、【人工血小板】実現の夢に向けた今後の課題を報告致します。



はんだ まこと、慶応義塾大学 医学部 輸血・細胞療法部 部長、准教授、慶大医(昭51)、医学博士
〒160-8562 新宿区信濃町35 mhanda@me.med.keio.ac.jp

【人工血液に対する思い】 20年以上にわたり一貫して血小板の臨床と基礎研究に取り組んできました。
血小板の止血機能を代替する人工物を創製する夢を追求しています。



プログラム

- 13:30~13:40 「開会の挨拶」
慶應義塾大学 医学部 外科 教授 小林 絃一
- 13:40~13:50 「挨拶」
厚生労働省 医薬食品局 血液対策課 課長補佐 武末 文男
- 13:50~14:00 「挨拶」
日本赤十字社 血液事業本部
血液事業経営会議 総括委員 田所 憲治
- 14:00~14:35 「人工赤血球の臨床応用に当たっての問題点と対策・開発現況」
(座長) 川崎医科大学 名誉教授 高折 益彦
(東宝塚さとう病院 名誉院長)
(演者) 慶應義塾大学 医学部 外科 教授 小林 絃一
- 14:35~15:10 「救急災害医療に対応できる人工赤血球の開発、
ショックにおける投与の安全性、虚血モデルでの研究成果」
(座長) 慶應義塾大学 医学部 外科 専任講師 饗庭 了
(演者) 慶應義塾大学 医学部 外科 准教授 堀之内宏久
- 15:10~15:25 休憩
- 15:25~16:00 「物質としての人工赤血球の特徴」
(座長) 慶應義塾大学 医学部 外科 教授 小林 絃一
(演者) 早稲田大学 理工学術院
理工学研究所 准教授 酒井 宏水
早稲田大学 理工学術院
理工学研究所 名誉教授 土田 英俊
- 16:00~16:35 「臨床応用可能な人工血小板の性能と安全性の評価」
(座長) 早稲田大学 理工学術院
生命医科学科 教授 武岡 真司
(演者) 慶應義塾大学 医学部
輸血・細胞療法部 准教授 半田 誠
- 16:35~16:45 「閉会の挨拶」
慶應義塾大学 医学部 内科 教授 池田 康夫

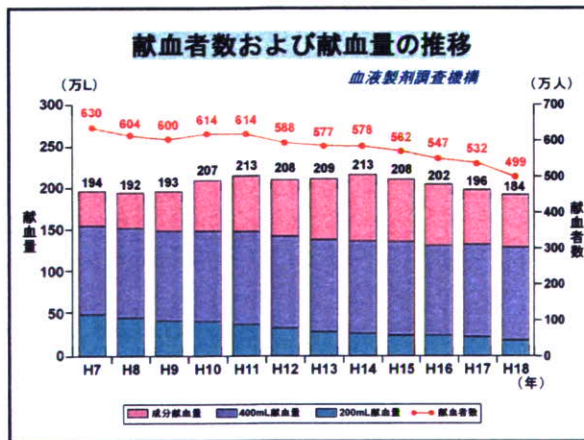
人工血液をつくる (8)
臨床応用可能な人工血小板の性能と安全性の評価

慶應義塾大学輸血・細胞療法部 半田誠

- **我々のプロトタイプ人工血小板**
 - 人工血小板の性能
 - 人工血小板の安全性
 - 展望

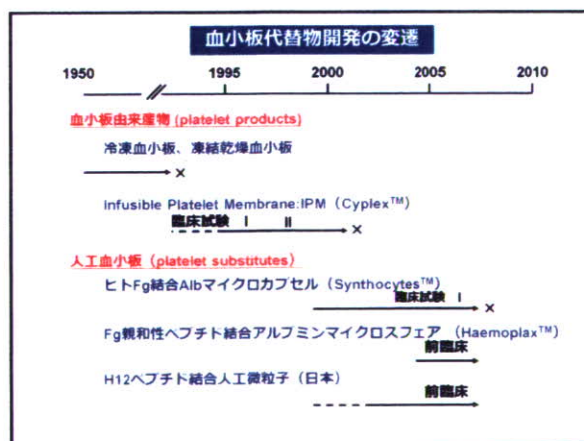
輸血用血小板製剤の問題点

- 1) **保存期間、保存条件 (緊急対応不可)**
短い: 3日間、嚴重: 室温・振盪、予約制
- 2) **輸血感染症**
細菌感染: 要スクリーニング (欧米)
- 3) **急性副反応**
アレルギー・アナフィラキシー反応など
- 4) **輸血不応**
抗HLA同種抗体、抗HPA同種抗体
- 5) **コスト**
濃厚血小板10U: ¥ 76,812
(赤血球濃厚液2U: ¥ 16,338)



人工血小板の利点

- 1) 緊急時の輸血対応が容易
- 2) 輸血感染症のリスクがない
- 3) 安定した血液行政が可能



Haemostatix
Intelligent solutions for haemostasis

<http://www.haemostatix.com>

The Lead Product Artificial platelets - HaemoPlax™

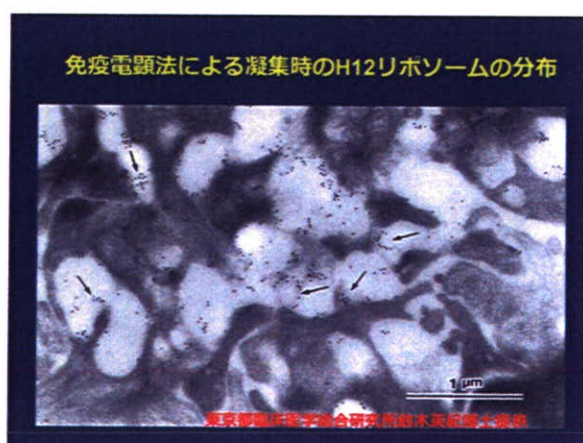
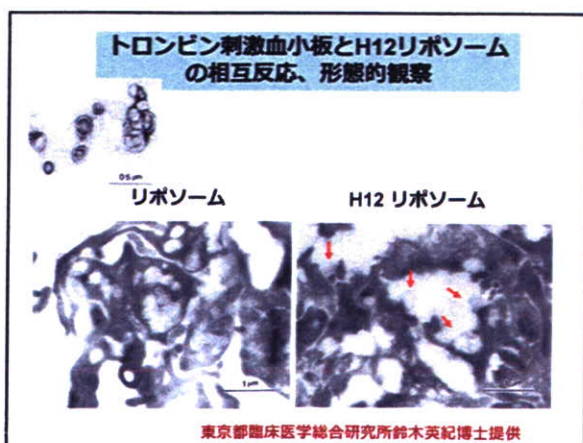
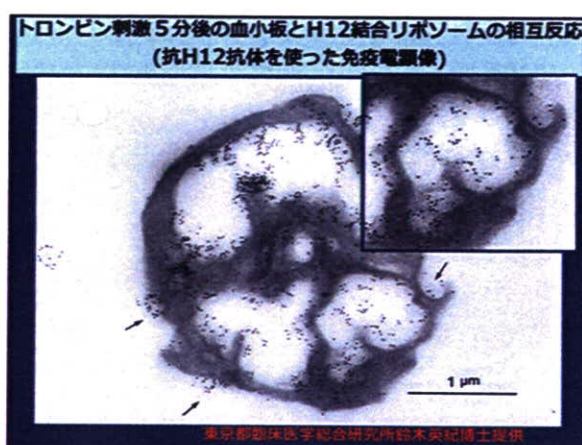
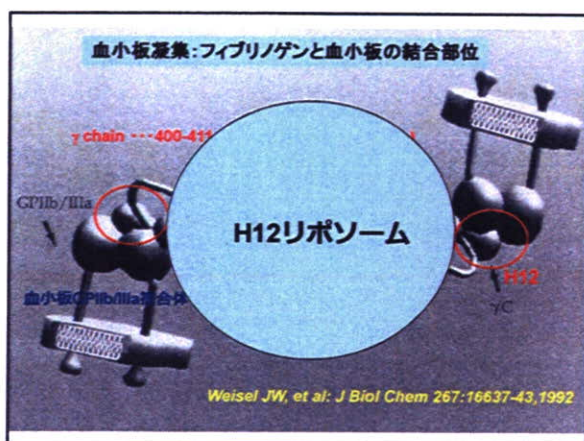
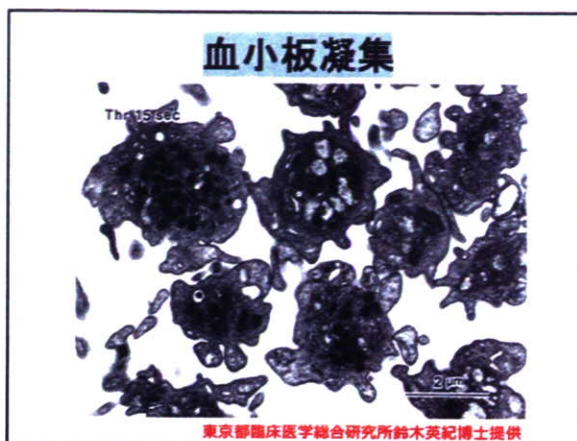
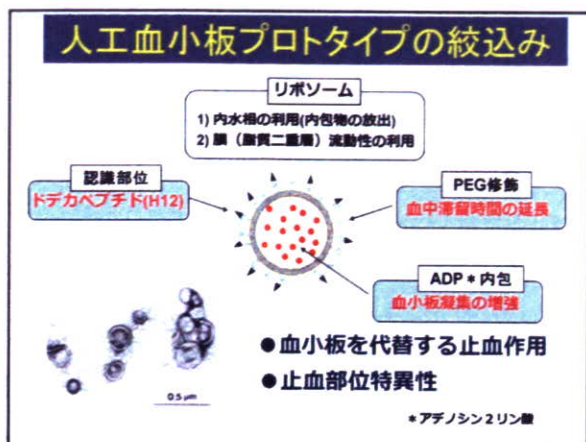
The development of the Haemostatix artificial platelets Haemoplax has been driven by this urgent need to find a safer, virus-free and more cost effective alternative to Platelet Transfusion.

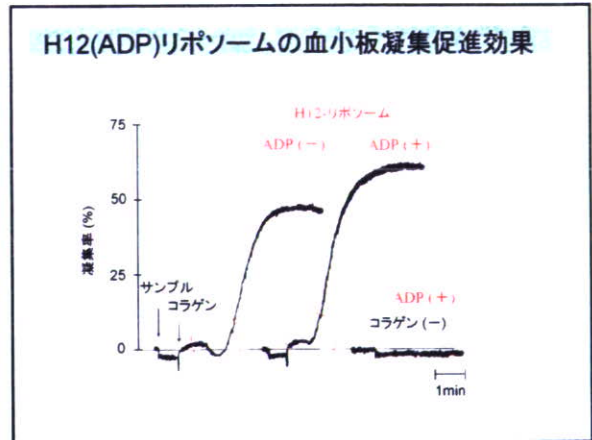
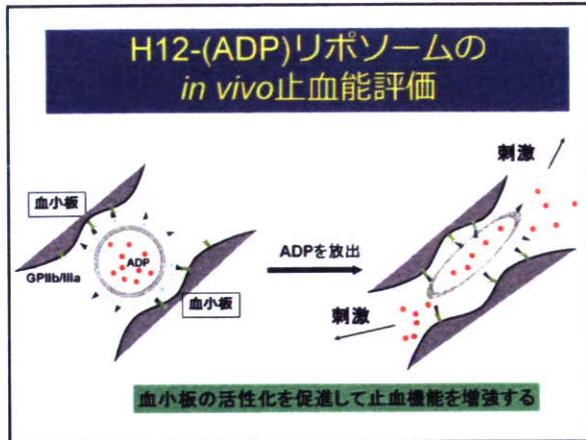
The design of HaemoPlax™ is based on a well established concept that when fibrinogen a protein involved in blood clotting is immobilised on a surface it binds with platelets to form a clot.

HaemoPlax™ is composed of small microspheres of human albumin to which are linked a propriety peptide which has affinity for fibrinogen. Following injection of the product, the peptide will bind to fibrinogen in the blood and by this means the microspheres will enhance the formation of blood clots in patients who are deficient in platelets.

The Company has applied a mechanistic approach and utilised an understanding of the molecular mechanisms involved in platelet fibrinogen and platelet-platelet interactions to design a product which will bind to platelets only at the site of a wound and not in the circulation.

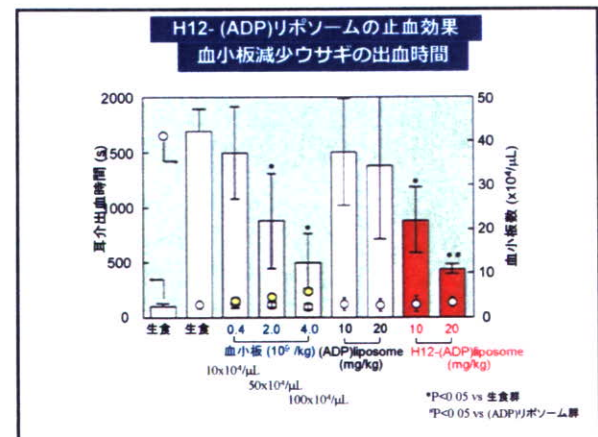
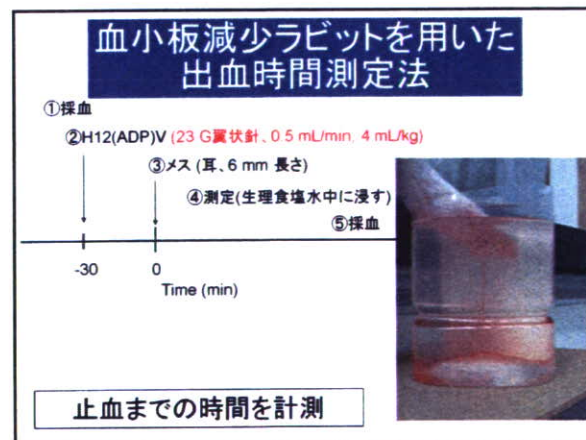
Unlike platelet concentrates for transfusion HaemoPlax™ will be sterile, with no risk of bacterial or viral contamination. The product will be freeze dried, with a predicted shelf life of at least 1 year.





- ### 人工血液をつくる (8) 臨床応用可能な人工血小板の性能と安全性の評価
- 農産構造大学 輸血・細胞療法部 半田誠
- 我々のプロトタイプ人工血小板
 - 人工血小板の性能
 - 人工血小板の安全性
 - 展望

- ### H12- (ADP)リポソームの止血機能: 血小板減少ウサギでの検討
- (1) 耳介出血時間の短縮
 - (2) 腹部術創出血量の減少

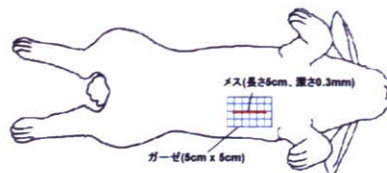


H12- (ADP)リポソームの止血機能: 血小板減少ウサギでの検討

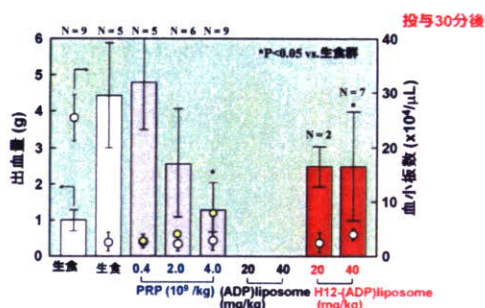
- (1) 耳介出血時間の短縮
- (2) 腹部術創出血量の減少

腹部手術モデルを用いたH12-(ADP)リポソームの止血効果

出血量(blood loss)の測定法
 1) 前腹壁(anterior abdominal wall)に、切傷(長さ5 cm、深さ0.3 cm)する。
 2) あらかじめ重量を測定したガーゼ(5 x 5 cm)を傷口に置き、5分間血液を吸収させる。
 3) ガーゼの重量測定(出血量)



腹部手術モデルを用いたH12-(ADP)リポソームの止血効果



H12- (ADP)リポソームの止血効果 血小板と比較

ウサギ

ヒト

血小板

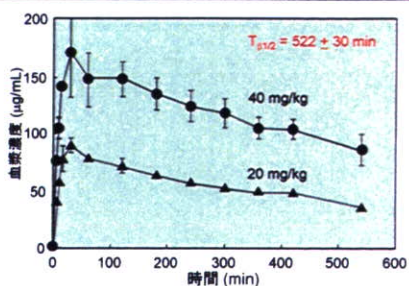
2-3 μm
 4.0×10^9 個 / $(8.2 \times 10^{10} \mu\text{m}^3 / \text{kg})$
 4.0×10^4 個 / μl の増加 \rightarrow 4.0×10^9 個 / kg (10単位、 2.0×10^{11} 個 / μl の増加)

H12 (ADP)リポソーム

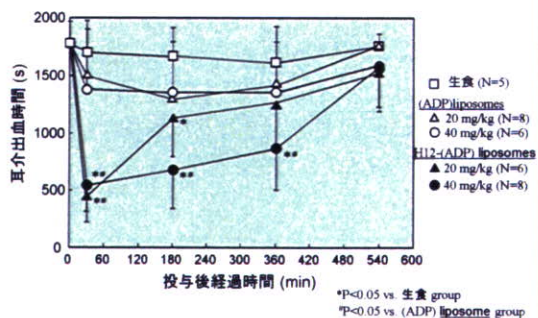
250+80 nm
 2.0×10^{13} 個 / kg \rightarrow $(4.1 \times 10^{11} \mu\text{m}^3 / \text{kg})$
 血小板に匹敵する止血効果が期待される

H12(ADP)リポソームの血中濃度推移 (N=3) 正常ウサギ

H12(ADP)リポソーム (DIOC₁₈ 20,40 mg/kg) → 採血 (200 μL) → centrifugation (12000rpm, 5 min) → 上清を可溶性(1% C₁₂E₉) → Fluorescent Intensity (E_x 495 nm, E_m 510 nm)



H12-(ADP)リポソームの止血能持続効果



H12- (ADP)リポソームの止血部位集積性

(1) ラット尾静脈切創の出血部位
 (2) ラット頸静脈の塩化鉄傷害血栓部位

CT観察の流れ

動物: Wistar雄性ラット (250-300 g)

① H12-(iopamidol)小胞体 (130 mg/kg, i.v.)

② メス (尾静脈, 10 mm 長さ)

③ 出血 (生理食塩水中に浸す) (止血するまで)

④ 犠牲死

⑤ CT観察

Time (min)

H12- (iopamidol)リポソームの出血部位への特異的集積

ラット尾切創 縦断面 横断面 3次元イメージ

H12- (iopamidol)リポソームの出血部位への特異的集積 (対照試験)

生食 造影剤 (造影剤)リポソーム

H12- (ADP)リポソームの止血部位集積性

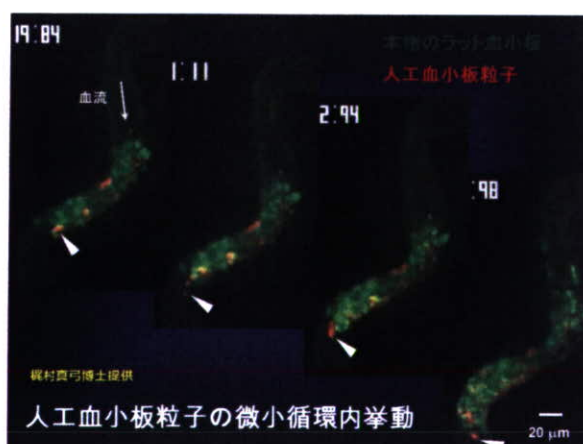
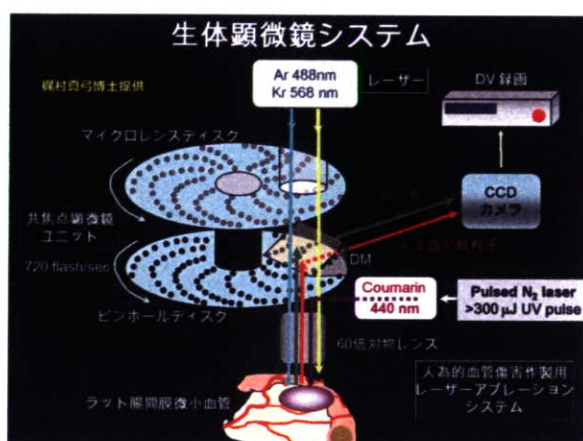
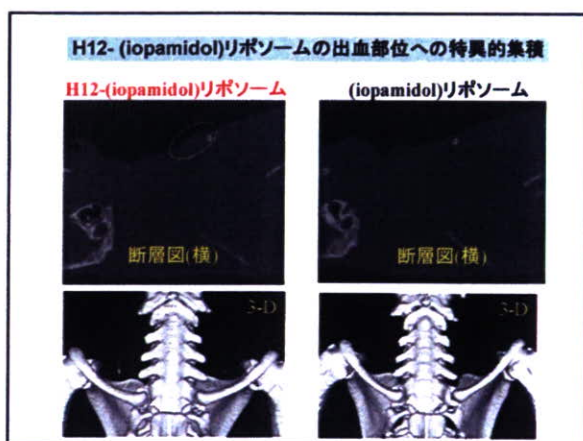
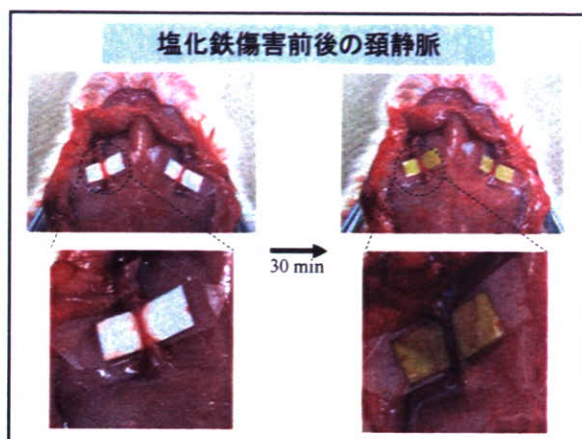
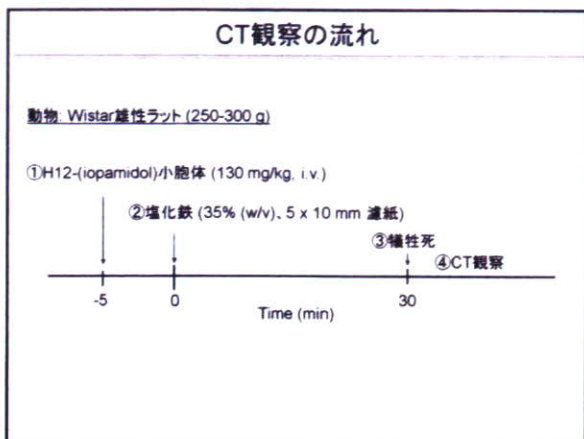
(1) ラット尾静脈切創の出血部位
 (2) ラット頸静脈の塩化鉄傷害血栓部位

塩化鉄傷害血栓モデル

Kurz, K.D. et al. *Thrombo. Res.* 60, 269-280 (1990)

- 動物: SD rat
- 薬剤: 35%塩化鉄($FeCl_3$)を濾紙に浸し、経時的に血栓形成過程を観察
- 麻酔: ネンブタールを筋注

血管内皮細胞
 血管内皮下組織 (コラーゲン)
 濾紙 (35% $FeCl_3$)
 パラフィン



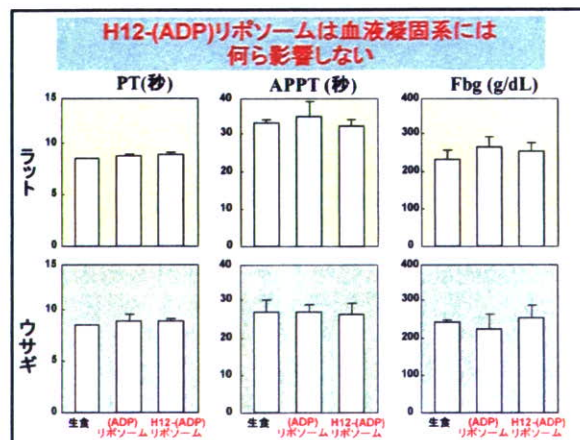
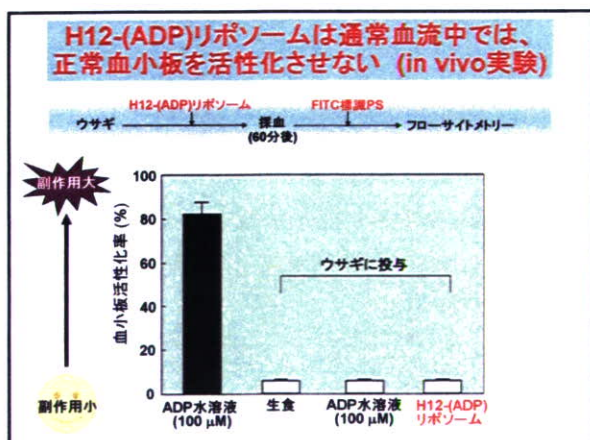
人工血液をつくる (8)
臨床応用可能な人工血小板の性能と安全性の評価

農産畜産大学輸血・細胞療法部 半田誠

- 我々のプロトタイプ人工血小板
- 人工血小板の性能
- 人工血小板の安全性
- 展望

H12-(ADP)リポソームの安全性

- (1) 流血中で血小板を刺激するか否か
- (2) 凝固系を刺激するか否か



人工血液をつくる (8)
臨床応用可能な人工血小板の性能と安全性の評価

農産畜産大学輸血・細胞療法部 半田誠

- 我々のプロトタイプ人工血小板
- 人工血小板の性能
- 人工血小板の安全性
- 展望

現在までの研究成果

Biomacromolecules 2:1192-1197 (2001), *Biochem Biophys Res Commun* 296:765-770 (2002), *ibid* 306:256-260 (2003), *ibid* 312:773-779 (2003), *Transfusion* 45 : 1221-1228 (2005), *Transfusion* 47 : 1254-1262 (2007).

- 血小板輸血に匹敵する止血効果 (血小板減少動物) を示す人工微粒子 (人工血小板: H12-(ADP)リポソーム) が創製された。
- 人工血小板は十分な血中滞留性を保持し、生体内での血小板の活性化や血液凝固系への影響は認められなかった。

人工血小板の条件

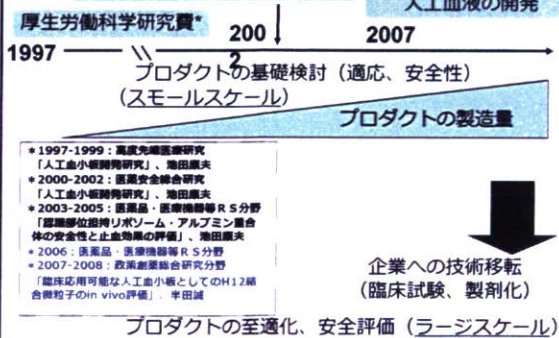
- 1) 血小板機能をすべて兼ね備える必要は無いが、止血に必要な最小限の機能を有し、残存血小板機能を補強、増幅し得る。
- 2) 血流中で血栓を形成しない。
- 3) 正常血小板の産生を抑制しない。
- 4) その他：長期保存可能で常時使用可能
反復投与が可能
副作用がない
低コストである

これからの課題

- 止血機能の最適化
 - 出血時間以外の動物評価系の確立
 - 血中滞留時間の延長
- 安全性の評価
 - 血栓性（病的血栓誘発）
 - 抗原性（単回投与と反復投与）

人工血小板／血小板代替物の開発

血液法制定：人工血液開発促進 イノベーション25：人工血液の開発



平成19年度厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）

臨床応用可能な人工血小板としてのH12結合微粒子のin vivo評価

- (主任研究者) 半田 誠(慶應義塾大学医学部)
 (分担研究者) 池田康夫(慶應義塾大学医学部)
 武岡真司(早稲田大学理工学部)
 梶村真弓(慶應義塾大学医学部)
 後藤信哉(東海大学医学部)
 鈴木英紀(東京都臨床医学総合研究所)
 村田 満(慶應義塾大学医学部)
- (研究協力者) 岡村陽介(早稲田大学理工学部)