

201108005A

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定と
GMP 製造技術の確立

(研究課題番号：H21-政策創薬-一般-006)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀之内 宏久
(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 24 (2012) 年 5 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定と
GMP 製造技術の確立

(研究課題番号：H21-政策創薬-一般-006)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀之内 宏久
(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 24 (2012) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告書	1
堀之内 宏久（慶應義塾大学 医学部 外科 准教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 堀之内 宏久（慶應義塾大学 医学部 外科 准教授）	7
2. 小林 紘一（慶應義塾大学 医学部 外科 名誉教授）	19
3. 池田 久實（北海道赤十字血液センター 名誉所長）	33
4. 小田切 優樹（崇城大学 薬学部 教授）	40
5. 高折 益彦（東宝塚さとう病院 名誉院長 / 川崎医大名誉教授）	52
6. 酒井 宏水（早稲田大学 重点領域研究機構 教授）	54
7. 足立 健（防衛医科大学校 内科学教室 教授）	61
8. 高野 久輝（ニプロ(株) 人工臓器開発センター センター長）	69
9. 菊地 武夫（ニプロ(株) 医薬品研究所 所長）	72
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	79
IV. 研究成果の刊行物・別冊	81

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定とGMP製造技術の確立

研究代表者 堀之内宏久 慶應義塾大学医学部 外科 准教授

研究要旨

我が国では、献血・輸血供給のシステムは世界最高水準にあり、国民の健康・福祉に貢献しているが、輸血感染症、ヒューマンエラーの点で完全ではない。感染の可能性がなく、血液型にかかわらず備蓄可能な人工赤血球の開発は輸血治療を補完するものとして政策的にも実現すべき課題である。

期限切れ献血血液よりウィルス除去、不活化、血液型物質除去工程を経て得られた高純度ヘモグロビン溶液を濃縮し、脂質2重膜で被覆したヘモグロビン小胞体（以下HbVと記す）は分子集合技術とナノ技術を駆使して作成され、従来型の分子状人工酸素運搬体の欠点を克服する物質である。現在、均質で高品質なGLP試料を用いて生体適合性試験(血液適合性、血行動態、呼吸機能、免疫反応、神経毒性、造血機能、蓄積性など)をほぼ終了し、臨床適応となる疾患モデルを用いて大量輸注、急速投与の安全性を確立した。また、臨床検査機器との干渉を避ける方法、新たな臨床検査機器の開発も行った。

本研究では、①GMP製剤製造に向けて製造工程における問題点を整理して早期に臨床応用を図るため、医薬品医療機器総合機構(PMDA)の行う戦略薬事相談のシステムに参加し、臨床応用までのロードマップを作成すること、臨床応用を目指し、②動物モデルにおいてHbVの有効性、生体に与える影響、還元剤による機能寿命延長の可能性、③免疫系に与える影響、④心機能に与える影響を明らかにする。⑤霊長類を用いたHbVの代謝系への影響を確認する。⑥微小環境におけるHbV投与の影響を確認すること、酸素治療薬としてレーザー治療の補助剤としての使用の可能性について、⑦HbVの製造収率を今まで以上に向上させるための新しいリポソーム生成法を開発すること、⑧滅菌製造についての最終的な考え方を検討する、⑨臨床治験を行う際の治験第1相試験のプロトコルの作成、⑩安定的な試料製造を通じてGMP製剤製造を促進することを目的とした。

その結果、①PMDAにおける戦略薬事相談のセミナーに参加し、事前面談を繰り返し、論点を整理することにより臨床応用までに行うべき問題点が浮き彫りとなった。そして、②HbVを生食分散のまま出血性ショックに用いることで、洗浄赤血球とほぼ同様な蘇生効果を得ることができ、HbVは生食分散でも十分な蘇生効果を持つことが明らかとなった。また、メチレンブルーとアスコルビン酸を用いてメト化した鉄分子を還元し、HbVの機能寿命を延長することが可能であった。③ラット脾細胞はHbV投与によって一過性の免疫抑制を呈するが、Hbを含有しない空リポソームを用いて脾細胞の増殖抑制にかかわる分子機構を検討し、細胞周期調整蛋白であるcyclinD3,およびD2の発現抑制が関与していることが考えられた。④ラット摘出灌流心を用いた虚血心に対するHbVの心機能回復効果について検討したところ、洗浄赤血球と同等の回復を認めた。これはNO合成阻害、あるいはMitochondrialKATP-channelの阻害を起こしても回復が認められ、赤血球あるいはHbVの酸素運搬能力による心機能の回復と考えられた。⑤アカゲザルを用いたHbV1400mgHb/kgを投与し、代謝様式と生体反応を検討し、一過性のAST,ALTの上昇を認めたが、明らかな有害事象は見いだせず、十分な血中滞留性を有していることが明らかとなった。⑥マウスの背部に設けたDorsal skinwindow chamberから観察される細動脈壁における酸素拡散を検討し、HbV投与は酸素拡散、細動脈壁における酸素消費に大きな影響を与えないことが明らかとなった。また、血管腫に対するレーザー治療への応用を考慮し基礎検討を行った。⑦混錬法によるHbVの新たな製造法を開発し、効率高く製造できる(50-70%)ことが確認された。スケールアップでの検討が必要である。⑧HbVは粒径が260nmなので、滅菌フィルターを通過せず、最終滅菌工程について検討が必

要であった。各種の滅菌法について検討したが、大量投与にも耐えられる方法はなく、無菌素材を用いた無菌製造法の開発が必要であると結論付けた。⑨第一相治験にふさわしい製剤が準備できた段階で行うべき第1相治験のプロトコールを検討し、投与方法、評価法について策定した。⑩GMP製剤製造のためメトヘモグロビン精製を指標に保存安定性を検討、十分な脱酸素化が長期保存で有効という結果を得た。また、ヘモグロビンの精製工程で安定化と長期貯留保管が可能となるシステムを構築できること、閉鎖系による無菌製剤製造が必要であると考えられた。

研究分担者

小林 紘一 慶應義塾大学医学部外科名誉教授
池田 久實 北海道赤十字血液センター 所長
小田切優樹 熊本大学大学院医学薬学研究部
客員教授／崇城大学薬学部 教授
高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長
川崎医大 名誉教授
酒井 宏水 早稲田大学総合研究機構 主任研究員 (研究院准教授)
足立 健 防衛医科大学校 内科学教室 教授
高野 久輝 ニプロ(株) 人工臓器開発センター
センター長
菊地 武夫 ニプロ(株) 医薬品研究所 所長

A. 研究目的

HbVの臨床応用を目指した試料製造と製造した試料を用いた動物試験を通して臨床応用を促進することが本研究の最終目標である。本年度は①GMP製剤製造に向けて製造工程における問題点を整理して早期に臨床応用を図るため、医薬品医療機器総合機構(PMDA)の行う戦略薬事相談のシステムに参加検討を重ねて臨床応用までのロードマップを作成することを目的とした検討を行った。また、臨床応用を目指し、②出血性ショックモデルを用いてHbVの有効性を検討する際に、昨年度までは膠質液を同時に投与していたが、本年度の研究では持続出血モデルを用い、晶質液輸液のみでの蘇生を行い、HbV投与の有用性を検証することを目的とした。また、③免疫系に与える影響をHbを含む空のリポソームを用いて検討し、NO合成酵素阻害、細胞周期調整蛋白について検討した。さらに、④心筋虚血後にHbVを投与することで心筋に与える影響を明らかにすること、⑤霊長類を用いたHbVの代謝系への影響を確認すること、⑥微小環境、特に細動脈の酸素拡散と酸素消費についてHbV投与の影響を確認

し、酸素治療薬としてレーザー治療の補助剤としての使用の可能性について検討し、⑦HbVの製造収率を今まで以上に向上させるための新しいリポソーム生成法を開発すること、⑧無菌製剤製造についての最終的なコンセプトを検討した。最後に臨床使用が可能なHbV製剤が完成した場合に備えて⑨臨床治験を行う際の治験第一相試験のプロトコールの作成を行うと同時に⑩安定的な試料製造を通じて臨床応用を促進することを目的とした。

B. 研究方法

①HbVの臨床応用のための医薬品医療機器総合機構における戦略薬事相談の活用

HbVの研究は順調に進んでいるが、開発は前臨床の段階で停滞している。臨床応用を促進するために医薬品医療機器総合機構の戦略薬事相談のセミナーに参加し、事前相談と対面助言を得て臨床応用へのロードマップを作成する試みを行った。

②ラット制御継続出血ショックモデルを用いた生理食塩水分散HbVによる蘇生法の検討、およびメチレンブルー及びアスコルビン酸を配合した還元剤適用によるHbVの機能回復の試み

大量出血による出血性ショックの治療では膠質輸液が重要であるが、生食分散のHbVをそのまま使用して、晶質輸液としての蘇生効果を検討した。Wister系ラットを用いて継続出血ショックモデルを作成し、総出血量に対して3倍量の輸液を行って蘇生効果を検討した。生食群では出血量の3倍の生食を、HbV群では出血量と等量のHbV分散液を用いて蘇生を行った後にと出血量の2倍量の生食を用いて蘇生を継続した。洗浄赤血球群では出血量と等量の洗浄赤血球液を用いて蘇生を行った後に出血量の2倍量の生食を用いて蘇生を行い、その後動物は覚醒させて24時間にわたり、血圧、ヘマトクリット、血中乳酸値、Base excess,pH,血液ガス、血清電解質について検討した。

生体内での機能寿命を延長するかは重要な

課題であり、還元剤としてメチレンブルー-アスコルビン酸混合液を用いて投与経路、投与量、投与後の効果についてラットを用いて検討した。

③HbVが免疫系に与える影響とその機序の解明

HbVの構成成分で、Hbを内包しない空のリポソームを用いて脾臓リンパ球の増殖に関する転写因子STAT5および細胞周期にかかわる蛋白質群 (CyclinD3,D2,p27kip1) の発現について一酸化窒素合成酵素阻害薬、ConA刺激などを用いて検討した。

④心筋に対するHbVの作用を検討するため、ラットランゲンドルフ灌流心を用い、虚血操作後にHbVを含有する灌流液で灌流を行い、心機能の回復を検討し、NO合成阻害薬あるいはMitochondrial K_{ATP} -channel開口阻害薬を用いてHbVの心筋に対する作用を検証した。

⑤HbVの体内動態特性に関する検討(霊長類での検討)

霊長類におけるHbVの安全性と体内動態特性を評価するため、カニクイザルを用い1400mgHb/kgのHbVを静脈内に投与し、血圧、血液ガス、血清生化学、体内動態を検討した。

⑥微小環境における組織への酸素拡散から見たHb小胞体の影響および人工赤血球を利用した単純性血管腫のレーザー治療のための基礎研究

微小環境での酸素分子の移動状況をマウスDorsal skinfold window chamberを用いて細動脈壁の酸素拡散、酸素消費について検討した。ピエゾ駆動ステージを用い、レーザー励起パラジウムコプロポルフィリンの燐光の減衰から組織酸素分圧を求める方法を使って細動脈壁の内外の酸素環境をほぼ同時に計測する手法を用いて細動脈壁の酸素拡散係数および酸素消費率を測定し、HbVあるいはHb投与によりどのように変化するかを検討した。

また、単純性血管腫に用いられる色素レーザーはオキシヘモグロビンに吸収され、熱エネルギーに変換され、内皮を傷害することにより血管腫を治療するのであるが、血中のオキシヘモグロビンが増加すれば、治療効果が高くなる可能性があり、その基礎検討を赤血球分散液、HbV分散液、赤血球およびHbV分散液についてIn vitroで行った。

⑦混錬法によるHbVの効率の高い製造法の検討

HbVの効率の良い製造法を開発するために混錬法による製造を検討した。混合脂質を脂質混合後、凍結乾燥させて作成し、ヘモグロビン溶液を混じてシンキー社製混錬装置に装填し、30回の混錬操作を行った。製造されたHb小胞体について緒元を測定した。

⑧試料の滅菌法の検討

最終製剤を滅菌することは製剤の変性や、投与量が大量となる可能性を持っているため、添加物による方法は難しく、物理的な滅菌法も製剤の変性のことを考慮すると適当でない。ナノフィルターも滅菌条件を満たす200nmは使用できないため、困難である。無菌製造について検討した。

⑨臨床第一相試験のプロトコールは製剤が臨床治験に入る準備ができた状況で検討すべきではあるが、本研究の課題として今年度に検討した。

⑩HbV試料製造を行い、GMP製剤製造における品質管理、工程管理について検討した。iメトヘモグロビン生成と品質管理について、およびiiヘモグロビンの精製工程での収率についておよびHbVの無菌製剤製造について検討した。

C. 結果

① HbVの臨床応用のための医薬品医療機器総合機構における戦略薬事相談の活用

HbVの臨床応用を促進するために医薬品医療機器総合機構の戦略薬事相談のセミナーに参加した。事前面談を行い、最も早く臨床応用が可能と考えられた酸素治療薬として開発することとし、さらに事前面談を重ね、臨床応用への問題点を明らかにした。現在対面助言の資料を作成中であるが、赤血球代替物としての開発を主体とすべきとの意見もあり、現在調整中である。

② ット制御継続出血ショックモデルを用いた生理食塩水分散HbVによる蘇生法の検討

大量出血による出血性ショックの治療では膠質輸液が必要とされているが、継続出血モデルで生食分散のHb小胞体がショック蘇生に有効であるかどうかを生食分散の洗浄赤血球および生理食塩水と比較した。ショック蘇生後HbV群ではヘマトクリットは12%となった。24時間の生存を比較したところ、生理食塩水群は死亡例が多く、洗浄赤血球群、HbV群と有意差

があった。血液ガス、生化学検査ではアシドーシスの進行が洗浄赤血球群、HbV群では抑制されたが、HbV群では蘇生直後および24時間後で乳酸値が上昇し、アシドーシスが進む傾向を認めた。

HbVの生体内でのメト化を還元するため、メチレンブルー-アスコルビン酸混合液を選択し、投与経路を経口、頸静脈、腹腔ないとかえて投与したところすべての経路で還元効果が認められた。一方、致死的な水準までメトヘモグロビン比率が上昇するHbV高度血液交換モデルに対して傾向でこの還元剤システムを適用したところ、代謝の改善が認められ、生存が良好となった。

③ HbVが免疫系に与える影響とその機序の解明

マウス脾臓リンパ球のConA刺激による細胞増殖は空リポソームのよって減少し、NO阻害薬によって回復した。細胞周期に関与する遺伝子cyclin D3およびD2の発現は空リポソームの投与により減少していた。p27kip1の発現には空リポソームの投与による変化を認めなかった。

④ HbVの心筋虚血一再灌流障害に対する保護効果

ラットランゲンドルフ灌流心を用い、虚血操作後にHbVを含有する灌流液で灌流を行い、心機能の回復を検討した。30分虚血後の再灌流時に心機能の回復が認められた。この保護効果は洗浄赤血球で灌流しても認められた。また、NO合成阻害薬あるいはMitochondrial K_{ATP}-channel開口阻害薬を用いたときにも認められた。

⑤ モグロビン小胞体の体内動態特性に関する検討（霊長類での検討）

霊長類におけるHbVの安全性と体内動態特性の評価ではHbV投与による異常行動、瀕死状態は認めず、投与前後で血圧、血液ガスパラメーターに異常は認められず、霊長類においても十分な血中滞留性を有していた。一方、生化学検査値の中でASY,ALTの一過性の上昇（AST：投与一日目、正常値の5倍、ALT：投与1,3日後正常値の2倍）を認めたが、7日後には正常に復した。脂質パラメーターは投与後、上昇を示した。

⑥ 微小環境における組織への酸素拡散から見たHb小胞体の影響および人工赤血球を利用した単純性血管腫のレーザー治療のための基礎研究

細動脈壁の酸素拡散、酸素消費はHbV投与により優位な変化を認めなかった。対照としてHb溶液を投与したが、細動脈は著しく収縮した。Hb投与後の細動脈の酸素拡散係数は細動脈径を合わせると有意差を認めなかった。細動脈壁の酸素消費率はHbV投与により変化しなかった。Hb溶液の投与では細動脈壁の酸素消費率は減少する傾向にあったが、ばらつきが大きく、有意差は認められなかった。

赤血球分散液にHbVを混合し、色素レーザーを用いて温度上昇を調べたところ、波長595nm、パルス幅0.5msecエネルギー10J/cm²、照射回数2回で血液の加温が0.5度に達することが明らかとなった。

⑦ 混錬法によるHbVの効率の高い製造法の検討

混錬法によるHbVの製造では温度管理を行うことと、条件の設定により、50から70%の回収率で製造できることが明らかとなった。

⑧ 試料の滅菌法の検討

最終製剤の滅菌フィルターによる滅菌は製剤の粒子径より困難であり、原料を無菌化して無菌工程をもって無菌製剤を製造することの可能性を検討、日赤より供給される期限切れ赤血球には無菌保証はないが、これを精製、分離することで得られるHb溶液は滅菌工程、ウイルス不活性化工程、ウイルス除去工程を組み込むことが可能であり、無菌原料が得られると考えられた。脂質4成分も無菌状態での原料を得られることから、無菌製剤を無菌工程の中で製造することに著しい困難はないと結論した。

⑨ 臨床第一相試験のプロトコール策定

HbVは血液代替として使用する際には最低でも一般成人で400ml、症例のよってはより大量の投与が必要となるため、点滴静注による安全性試験に加えて脱血後のHbV投与による大量投与の安全性試験も第一相試験に組み込む方法を考案し、発表した。

⑩ GMP製剤製造方法の確立

GLP試料は安定的に供給できた。メトヘモグロビン生成は十分な脱酸素化を行うことで進行が抑制された。また、期限切れ赤血球より精製するヘモグロビンの収率は廃棄血の保存期間と相関していた。製剤の無菌検査は困難があり、新たな方法の開発が必要と考えられた。

D. 考察

① HbVの臨床応用のための医薬品医療機器総

合機構における戦略薬事相談の活用

HbVの臨床応用を促進するために医薬品医療機器総合機構の戦略薬事相談を活用することで現在臨床応用を阻んでいる問題点が明らかとなった。しかし、臨床応用の目的を狭い範囲に限定することの意義について議論があり、今後も調整が必要である。

② ラット制御継続出血ショックモデルを用いた生理食塩水分散HbVによる蘇生法の検討

大量出血による出血性ショックとして継続出血モデルを用いてHbVおよび洗浄赤血球、生理食塩液で蘇生効果を比較したが、HbV群では有意に生存を改善し、アシドーシスの進行を抑制できることから、膠質輸液と同時に使用せずとも出血性ショックの治療に利用できることが明らかとなり、現在までの結果と合わせて出血性ショックに対してHbV生食分散液をPermissive hypotensionの状態で使用し、搬送後にdefinitive hemostasisと集中試料を行うことで生存率を改善できる可能性があることが示唆された。

メチレンブルーアスコルビン酸を用いた還元系を体内に導入する試みは良好な結果を呈し、臨床使用時の機能延長にも適用できる可能性があると考えられた。

③ HbVが免疫系に与える影響とその機序の解明

HbVによるマウス脾臓リンパ球の一過性の抑制は空のリボソームによっても同様であることが明らかとなり、選択的な免疫抑制の方法として活用できる可能性が認められた。また、この抑制では、感染に対する抑制状態には陥らないことが前年度までの検討で明らかとなり、大量輸血によるTRALIなどの免疫異常を回避する手段としても使用できる可能性がある。

④ HbVの心筋虚血一灌流障害に対する保護効果

本年度は、心筋虚血を30分継続した後に、Hb小胞体を灌流し、心筋保護効果について検討したところ、再灌流後の心機能の回復が認められ、虚血心筋の再灌流よりの保護効果が認められた。この保護効果は洗浄赤血球で灌流しても認められ、また、NO合成阻害薬あるいはMitochondrial K_{ATP} -channel開口阻害薬を用いたときにも認められた。これらの事実から、HbVはNO合成阻害およびとともに酸素運搬も含め

て心筋を保護している可能性があると考えられ、今後の解析が必要と考えられた。

⑤ HbVの体内動態特性に関する検討（霊長類での検討）

霊長類におけるHbVの安全性と体内動態特性の評価では明らかな有害事象は認められず、小動物で認められたAST,ALTの一過性の上昇が認められた。投与量は1400mgHb/Kgと50kg成人男子であれば800mlのHbV製剤を100分かけて輸注することになり、臨床で予想される使用料にほぼ合致すると考えられた。体内での血中滞留性は十分であり、今後の臨床応用に向けて重要な情報となると考えられた。

⑥ 微小環境における組織への酸素拡散から見たHb小胞体の影響および人工赤血球を利用した単純性血管腫のレーザー治療のための基礎研究

HbV投与後の細動脈壁の酸素拡散、酸素消費の検討により、正常な状態では微小循環において酸素分子の移動と細動脈壁での消費には大きな影響を与えていないことが明らかとなった。出血ショックや貧血状態における変化についての検討が必要と考えられた。

赤血球分散液にHbVを混合し、色素レーザーを用いて温度上昇を調べたところ、波長595nm、パルス幅0.5msecエネルギー10J/cm²、照射回数2回で血液の加温が0.5度に達することが明らかとなった。HbVは血漿中に浮遊するので、色素レーザーのターゲット分子が血中で増加することとなり、治療の効率、効果が増強することが期待された。

⑦ 混錬法によるHbVの効率の高い製造法の検討

混錬法によるHbVの製造では密閉した環境で条件設定を行うことで、50から70%の回収率でHbVを製造できることが明らかとなり、今後のGMP製造において主流となる可能性がある。

⑧ 試料の滅菌法の検討

最終製剤の滅菌は昨年度までに高圧法、BPL法、銀粒子法などを検討したがHbVには適応できないことが明らかとなり、フィルターによる滅菌は製剤の粒子径より困難であることから、原料を無菌化して無菌工程をもって無菌製剤を製造することが解決法であると結論した。期限切れ赤血球の無菌保証はないが、Hb生成の段階で無菌、ウィルスフリーの状態を担保できると考えられ、無菌製剤を無菌工程の中で製造することに著しい困難はないと結論した。

⑨臨床第一相試験のプロトコール策定

HbVは血液代替として使用する際の第一相試験プロトコールは現在までも構想は練られていたが、研究班として検討し、大量投与にも見合う治験方法であると考えられた。

⑩HbVのGMP製剤製造方法の確立

均質な試料製造を継続的に行うことはHbVの開発研究に必要不可欠である。基準を満たす試料の製造がおこなわれた。GMP製剤を製造するための工程の見直しではメトヘモグロビン生成を抑えるために十分な脱酸素化が重要であること、製剤の無菌性の検査には新たな方法の開発が必要であること、無菌製剤製造のためには閉鎖系を用いた無菌製造が必要であると考えられた。

分担研究報告書

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定とGMP製造技術の確立

分担課題：

- (1) 微小環境における組織への酸素拡散からみたHb小胞体の影響
- (2) 人工赤血球を利用した単純性血管腫のレーザー治療のための基礎研究
- (3) Hb小胞体の臨床応用のための医薬品医療機器総合機構における戦略薬事相談の活用

研究代表者 堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部 外科学教室(呼吸器) 准教授

研究協力者 勢司 泰久 慶應義塾大学医学部 外科学教室 特任研究員

研究協力者 力久 直昭 千葉大学医学部附属病院 形成美容外科 助教

研究要旨

(1) マウスの背部に皮下微小循環を観察するためのウィンドウチャンバーを設け血管内径が40～90 μm の細動脈壁の酸素拡散係数および酸素消費率について人工酸素運搬体を投与することにより変化するか、また、組織の酸素分圧が変化するかについて検討した。その結果細動脈壁の酸素拡散係数は対照群では $8.88 \pm 3.13 \times 10^{-11} (\text{cm}^2/\text{s})(\text{ml O}_2 \cdot \text{cm}^{-3} \text{ tissue} \cdot \text{mmHg}^{-1})$ ヘモグロビン小胞体では $8.45 \pm 3.51 \times 10^{-11} (\text{cm}^2/\text{s})(\text{ml O}_2 \cdot \text{cm}^{-3} \text{ tissue} \cdot \text{mmHg}^{-1})$ in HbV group、そしてヘモグロビン溶液では $12.53 \pm 10.85 \times 10^{-11} (\text{cm}^2/\text{s})(\text{ml O}_2 \cdot \text{cm}^{-3} \text{ tissue} \cdot \text{mmHg}^{-1})$ in Hb group.であり、人工酸素運搬体の投与による細動脈壁酸素透過性の変化は認められなかった。また、酸素消費率の変化は対照群では $1.13 \pm 0.61 (\text{ml O}_2/100\text{cm}^3 \text{ tissue}/\text{min})$ であったが、ヘモグロビン小胞体投与群では $1.33 \pm 0.88 (\text{ml O}_2/100\text{cm}^3 \text{ tissue}/\text{min})$ 、ヘモグロビン溶液群では $0.789 \pm 0.577 (\text{ml O}_2/100\text{cm}^3 \text{ tissue}/\text{min})$ であった。各群間に有意差はなかった。(2) 単純性血管腫は生下時から存在する皮膚の赤色斑であり、真皮に拡張した異常毛細血管が存在する疾患である。単純性血管腫に対してレーザー治療が行われているが、現在でも赤色斑が完全に消退する症例は非常に少ない。人工赤血球を投与し血管内Hb濃度をあげ、光線治療の標的を増やした状態でレーザーを照射することができれば、単純性血管腫のレーザー・光治療の成績が向上すると予想される。本研究では人工赤血球に色素レーザーを一定の条件下で照射し熱産生量を人の血液と比較した。まず、検体（人工赤血球・血液・それらの混合液）のレーザー光の波長における吸光度を測定し比較した。次に諸条件下で検体に色素レーザーを照射して照射後の検体の温度上昇を測定した。その結果、レーザー照射至適条件は、波長595nm パルス幅0.5msec エネルギー $10\text{J}/\text{cm}^2$ 前後 照射回数2回であり、この条件で2mlの血液が 0.5°C ほど温度上昇することがわかった。今後は単純性血管腫の疾患モデルとして鶏冠を利用して生体下でのレーザー照射実験を行う予定である。(3) 本邦でヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体制剤の開発は1980年代より精力的に粉われているにもかかわらず、前臨床の段階で開発が停滞している。臨床応用を促進するために医薬品医療機器総合機構の戦略薬事相談を活用し、臨床応用へのロード-マップを作成する試みを行った。戦略薬事相談のセミナーに参加し、事前面談を通して臨床応用の最も有望な酸素治療薬としての開発を目指して問題点を整理し、現在、対面助言用の資料を準備中で

ある。

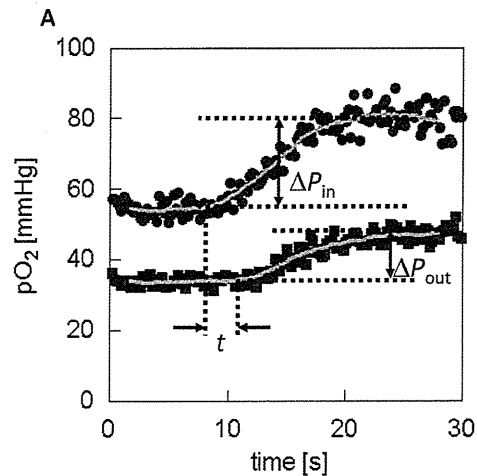
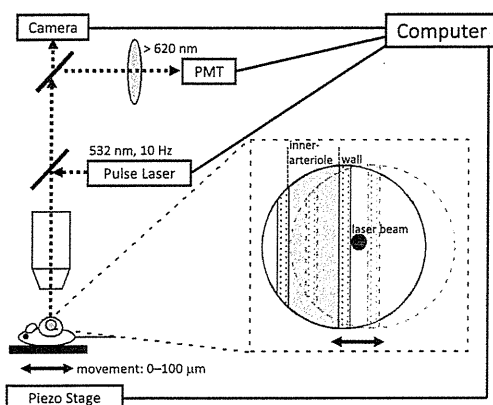
1. 微小環境における組織への酸素拡散からみた Hb 小胞体の影響

A. 研究目的

血管内から組織への酸素運搬は毛細血管において行われると考えられているが、細動脈部位でも酸素の拡散が起こっている。人工酸素運搬体は血漿相に分布し、酸素を運搬するので、細動脈領域での酸素拡散に影響を与える可能性がある。今回われわれは人工酸素運搬体として Hb 溶液と Hb 小胞体を用いて細動脈壁の酸素拡散係数および酸素消費量がどのように変化するかを計測したので報告する。

B. 研究方法

BALB/c マウス (雄性 33~38g) を用い、全身麻酔下にマウス背部皮下に Dorsal skinfold window chamber を設置した。Window 内の環境が落ち着く 48~72 時間後に測定を行った。のを待って、平成 22 年度に開発した方法を用いて内径 40~90 μ m の細動脈壁の酸素拡散係数を計測した。平成 21-22 年度に開発した方法はレーザー励起によるパラジウムコプロポルフィリンの燐光減衰を用いた局所の酸素分圧測定装置とピエゾステージによる異所同時酸素分圧同時測定を組み合わせた装置を用いて、細動脈壁の内外の酸素分圧をほぼ同時に継続的に測定することである。(図 1, 2)



大気を呼吸している動物にマスクより 100%酸素を吸入させると細動脈内の酸素濃度は約 1 秒後に上昇をはじめ、細動脈内の酸素分圧の上昇に続いて t 秒後に細動脈壁外側の組織酸素分圧が上昇してくる。細動脈内の酸素分圧の変化 ΔP_{in} と細動脈壁外の酸素分圧の上昇 ΔP_{out} から次の式を用いて細動脈の酸素拡散係数を求めた。

$$(1) \quad K=Da$$

$$(2) \quad D = \frac{(R_c + x)^2 - R_c^2}{4t}$$

$$(3) \quad \alpha_t = \frac{\Delta P_{out} (R_c + x)}{V_t \Delta P_{in} R_c}$$

この式で、酸素拡散係数は通常 1 匹に 2 か所、酸素消費率は 1 か所について計測を行った。

D は細動脈壁の酸素拡散係数、 α は細動脈壁の酸素溶解係数、K は Krogh の酸素拡散係数、x は細動脈壁厚、t は細動脈内の酸素分圧上昇開始時刻と細動脈壁外酸素分圧上昇開始時刻との差、 ΔP_{in} は細動脈内の酸素分圧の変化量、 ΔP_{out} は細動脈外側の酸素容量の変化量、 V_t は細動脈壁の容量、 R_c は細動脈内径の半径である。

酸素消費量 M は次の 4 式から計算によって求めた。

$$(5) \quad \alpha_t \frac{\partial P_t}{\partial t} = K \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} r \frac{\partial P_t}{\partial r} + \frac{\partial^2 P_t}{\partial z^2} \right] - M$$

$$(6) \quad P_t = P_w \text{ at } R_c$$

$$(7) \quad \frac{\partial P_t}{\partial r} = 0 \quad \text{at} \quad r = R$$

$$(8) \quad P_t = P_w(z) + \frac{M}{4K} (r^2 - R_c^2) - \frac{MR^2}{2K} \ln \frac{r}{R_c}$$

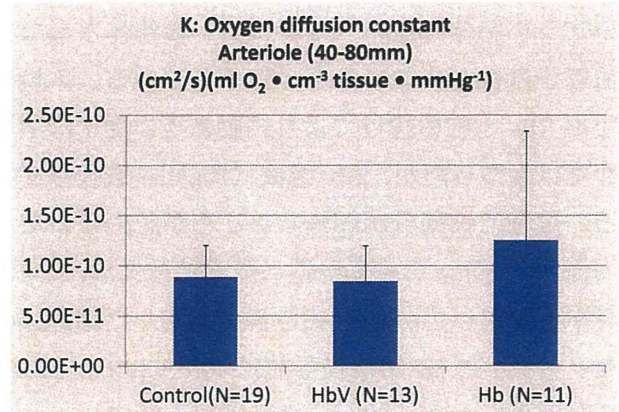
ここで、 P_t は組織酸素分圧、 P_w は細動脈壁の酸素分圧、 r は細動脈中心よりの距離、 R_c は細動脈の内腔半径、 K は酸素拡散係数、 R は酸素分圧が一番低下する部位での細動脈中心よりの距離。であり、 R は細動脈内外の酸素分圧および細動脈閉中心の祖初期酸素分圧より二次近似にて求めた減衰曲線より求めた。

測定時はマウスをケタミン/キシラジンカクテルの筋注により麻酔を行い、尾静脈より Pd コプロポルフリン (8.5mg/ml) を 0.1ml 静注し、30 分暗室に放置、その後尾静脈に 30G 針を留置したのちにステージに移動し、測定を行った。まず、無処置の状態にて測定を行った後に Hb 小胞体あるいは Hb 溶液 (10g/dl) を静注し、10 分経過後に酸素拡散係数と酸素消費率を測定した。1 匹に 2~3 か所の酸素拡散係数の測定と 1~2 か所の酸素消費率の測定を行った。

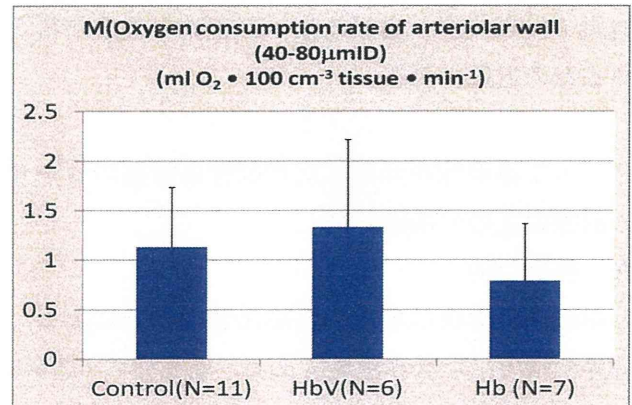
C. 結果

細動脈壁の酸素拡散係数は無処置群では $8.88 \pm 3.13 \times 10^{-11}$ ($\text{cm}^2/\text{s})(\text{ml O}_2 \cdot \text{cm}^{-3} \text{ tissue} \cdot \text{mmHg}^{-1})$ であり、Hb 小胞体投与時は $8.45 \pm 3.51 \times 10^{-11}$ ($\text{cm}^2/\text{s})(\text{ml O}_2 \cdot \text{cm}^{-3} \text{ tissue} \cdot \text{mmHg}^{-1})$ 、Hb 投与群では $12.85 \pm 10.53 \times 10^{-11}$ ($\text{cm}^2/\text{s})(\text{ml O}_2 \cdot \text{cm}^{-3} \text{ tissue} \cdot \text{mmHg}^{-1})$ であった。3 者の間に有意差はなかった。Hb 投与により、細動脈径は収縮するため、収縮したのちの血管径が 40~80 μm の部分にて計測を行

った。



細動脈壁の酸素消費率は細動脈壁組織 100g 当たりの酸素消費量として算出し、無処置群では 1.13 ± 0.61 ($\text{ml O}_2/100\text{cm}^3 \text{ tissue}/\text{min}$) であり、Hb 投与群では 1.33 ± 0.88 ($\text{ml O}_2/100\text{cm}^3 \text{ tissue}/\text{min}$) となり、Hb 投与群では 0.789 ± 0.577 ($\text{ml O}_2/100\text{cm}^3 \text{ tissue}/\text{min}$) であった。ヘモグロビン投与後は細動脈壁の酸素消費率は低かったが、有意差は認めなかった。



D. 考察

本検討の結果、Hb 小胞体投与により、細動脈における酸素拡散係数、および酸素消費率は無処置群と有意な変化を生じないことが明らかとなった。細動脈の酸素拡散は少ないとはいえ、組織への酸素拡散の一定の貢献をなしていると考えられる。Hb 人工酸素運搬体は血漿相に分布するため、通常の赤血球による酸素運搬に加えた酸素運搬が可能となる。酸素拡散係数が変わらなければ、細動脈

での酸素拡散は変化しないが、末梢の毛細血管領域へ到達する酸素量が増えることとなる。ヘモグロビン小胞体は他のヘモグロビン修飾体と異なり、血管作動性が少ないことが知られている。本検討でも Hb 小胞体投与により細動脈径の変化は明らかではなかったが、Hb 溶液 (10g/dl) を投与すると、数分で細動脈が収縮することが認められた。内径 40~90 μm の細動脈壁の酸素拡散係数、酸素消費率を測定したが、Hb 投与群で測定した細動脈のセグメントは Hb 溶液投与前は 40~90 μm よりは明らかに太いセグメントの細動脈壁を測定していることになる。細動脈壁の太さによる酸素拡散係数、および酸素消費率の推移についてはまだ未解析であり、人工酸素運搬体の酸素拡散については細動脈の収縮の要素を入れて考える必要があると思われる。

また、出血や慢性貧血などによる赤血球による酸素運搬低下、血管の狭窄や閉塞による循環障害時の虚血領域における細動脈壁の変化、および酸素運搬体投与時の効果等を解析することにより、組織の酸素代謝、酸素治療への正確な理解が得られるものと思われる。

2. 人工赤血球を利用した単純性血管腫のレーザー治療のための基礎研究

A. 研究目的

単純性血管腫は皮膚の毛細血管の拡張による、境界明瞭で平坦な赤色斑である。新生児の 0.3%に

みられ、性差はない。生下時から存在し身体の成長に比例し拡大する。項部・前額部正中に出現する赤色斑はウンナ母斑 (salmon patch) ともいい、2歳までに自然消退する傾向をもつ。しかしその他の部位にみられる赤色斑は生涯退縮することはなく、加齢とともに色調が暗紫色になり病変部が隆起し凹凸に肥厚することもある。拡張血管のみ消失させ傷跡なく、患部の色調を健全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、その熱エネルギー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 4)。単純性血管腫の治療では、レーザー光が血管内赤血球の oxyhemoglobin に吸収され、熱エネルギーに変換される。この熱エネルギー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る。熱エネルギーは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ない。Oxyhemoglobin への光の吸収率と皮膚内のその他の標的となりうる水分・コラーゲン・メラニンへの吸収率の関係、また光線の皮膚への深達度といった条件から 585~595nm の波長をもつ色素レーザーが単純性血管腫の治療に用いられている (図 1)。

単純性血管腫の治療の第一選択が色素レーザー治療となる根拠は、「異常血管のみに熱エネルギーを与えて、血管周囲の皮膚成分には熱障害を与えない」という上記の治療原理である。しかし、正

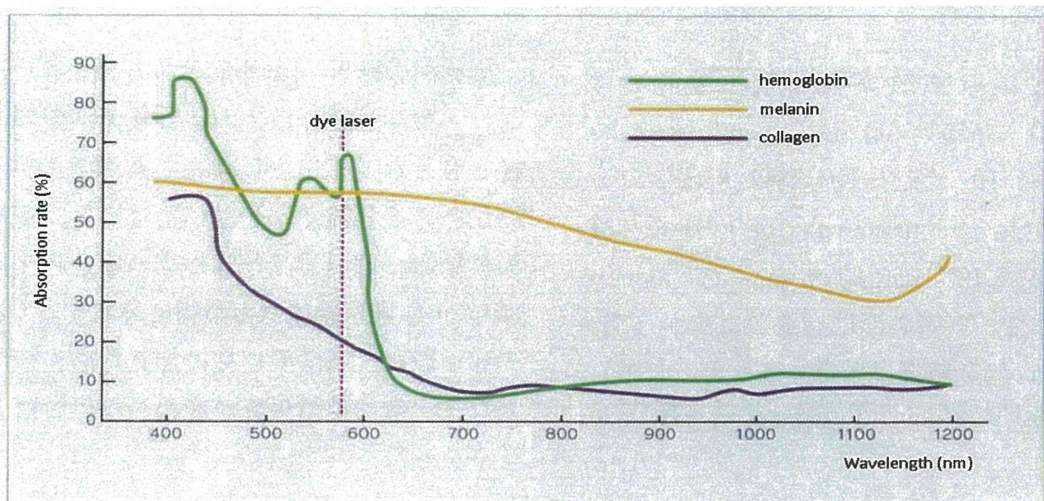


図 1. 皮膚内各組織の吸光度

常皮膚の表面を損傷することなく治療を進めることを第一とするため、その治療の切れ味は鈍い。病変は肉眼的には境界明瞭で平坦な赤色斑を呈するが、組織学的に観察すると血管径も血管壁の厚さも異なる毛細血管が真皮層に内にさまざまな密度と深さを持って存在している。このような異常血管の集団を均一なレーザー光で治療するため1回のレーザー照射で赤色斑が完全に消退することはほとんどない。レーザー治療で一定の効果を得るためには数か月単位の治療期間で複数回治療を行うことが必要である。

ヘモグロビン小胞体の直径は赤血球の30分の1と小さいので、単純血管腫の患者に hemoglobin を利用した血液代替物を静脈投与した時、血管内では赤血球の間を埋めるように血液代替物が存在すると考えられる(図2)。毛細血管内での血液代替物の流動特性についての基礎研究をふまえて、適切に血液代替物を投与することが可能になれば、毛細血管内の oxyhemoglobin 量を増やすことができるようになる。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非常に細い異常血管に対しては特に優れた治療になると期待できる。

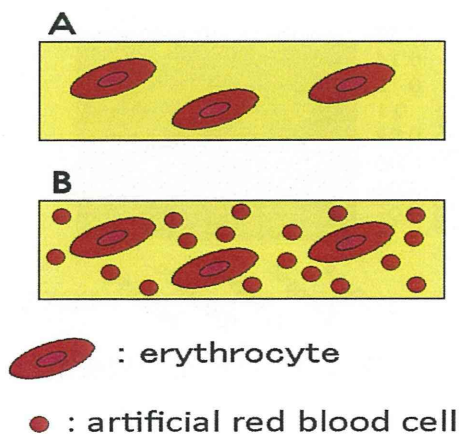


図2. 毛細血管内の赤血球と人工赤血球

B. 研究方法

1. 試験系およびセッティング

吸光度の測定には Pharmacia Biotech Ultrospec 3000UV/Visible Spectrophotometer, を用いた。高濃度のヘモグロビン濃度の検体では光線の透過性が保てず、吸光度を測定できなくなるため、適宜検体を希釈して吸光度を測定した。また同時に肉眼的に検体を観察した。色素レーザーの照射にはサイノシア-製 V-star (595nm 波長 0.5~40msec) を用いた。レーザー照射前後の検体の温度測定にはサーモプローブ社製 高分解能デジタル温度計 TL1-R12 (最小表示単位 0.001 度 精度±0.06 度) を用いた。検体とレーザー装置のハンドピースとの間を一定の距離を保ってレーザー照射するため、専用の固定器具を作成した。室温を 25 度に設定し、検体・スピッツ・固定器具を 6 時間部屋に置きそれぞれの温度を室温とした状態で実験を行った。

2. 群構成

検体を 3 群に分けた。すなわち①人血液の生理食塩液分散液 (hBlood/Sal) 群, ②人工赤血球の生理食塩液分散液 (HbV/Sal) 群, ③ (hBlood/Sal) と (HbV/Sal) の混合液とした。

3. 観察測定

595nm の光の吸光度, レーザー照射後の検体の温度上昇を測定した。

C. 結果および考察

1. 吸光度

3 群の溶液のヘモグロビン濃度を 10.0/dl に調整した。この原液を生理食塩水で希釈し、ヘモグロビン濃度が異なる hBlood/Sal 群, HbV/Sal 群, hBlood/Sal と HbV/Sal の混合液の 595nm の吸光度を測定して以下のグラフ(図3)を得た。濃度が 0.1g/dl から 1g/dl の範囲では HbV/Sal 群は hBlood/Sal 群に比べて高い吸光度を示した。ヘモグロビン濃度が 1g/dl から 2g/dl の範囲では hBlood/Sal 群の方が高い吸光度を示した。ヘモグロ

ビン濃度が2g/dl以上の時は吸光度が高すぎたため、使用した吸光度計では測定できなかった。

またそれぞれヘモグロビン濃度を1g/dlに希釈したhBlood/Sal溶液、HbV/Sal溶液、混合液群の肉眼的に比較した。HbV/Sal溶液はやや白色を帯びて濁った色調を示し、hBlood/Sal溶液に比較し透過性が落ちていた(図4)。

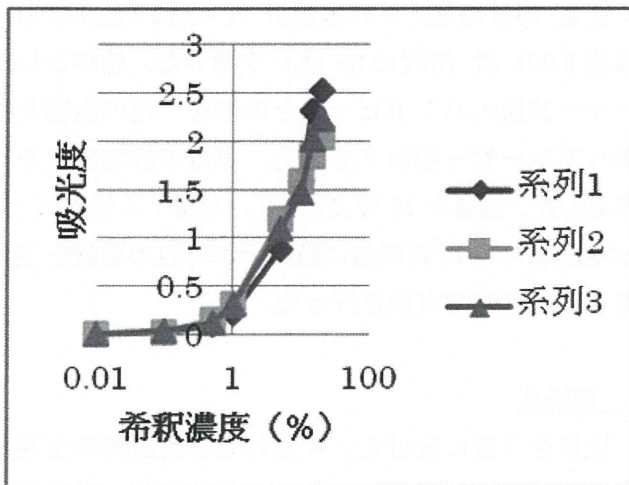


図3. 人血液の生理食塩液分散液 (hBlood/Sal) 群, 人工赤血球の生理食塩液分散液 (HbV/Sal) 群, (hBlood/Sal) と (HbV/Sal) の混合液群の 595nm の吸光度。系列1は hBlood/Sal 群の吸光度を, 系列2は HbV/Sal 群の吸光度を, 系列3は hBlood/Sal と HbV/Sal の混合液群の吸光度を示している。

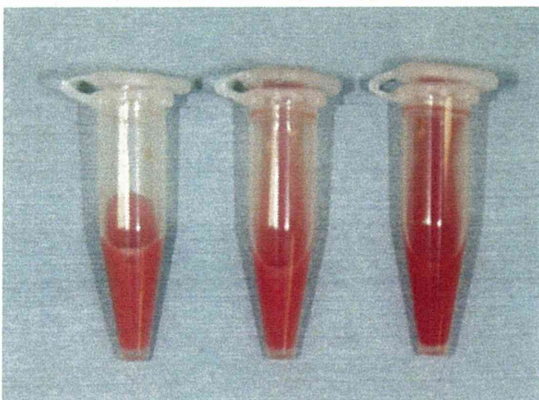
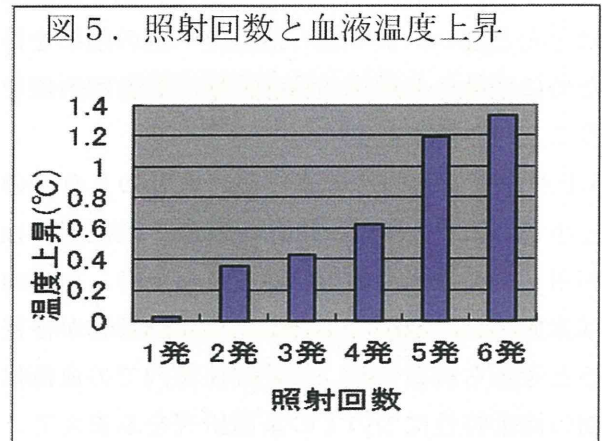


図4. 人血液の生理食塩液分散液 (hBlood/Sal), 人工赤血球の生理食塩液分散液 (HbV/Sal), (hBlood/Sal) と (HbV/Sal) の混合液の肉眼的観察
左: HbV/Sal, 中央: 混合液, 右: hBlood/Sal

2. 各パラメーター条件下でレーザーを照射し温度上昇を測定した結果

人の血液 2ml (ヘモグロビン濃度 14.9g/dl) に色素レーザー (パルス幅 0.5msec. 照射エネルギー 15.2J/cm²) を照射回数を変更して照射した結果, 以下のグラフ (図5) を得た。



人の血液 2ml (ヘモグロビン濃度 14.9g/dl) に1回あたりの照射エネルギー (J/cm²) を変えながら色素レーザー (パルス幅 0.5msec.) を2回照射した結果, 以下のグラフ (図6) を得た。

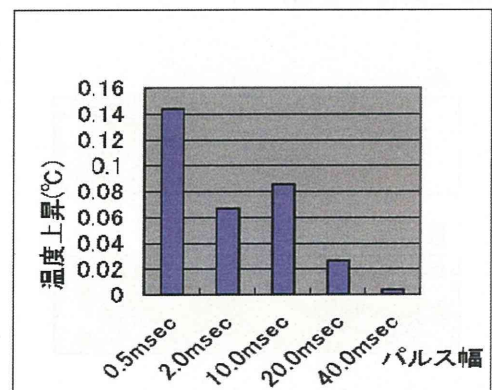


図6. 照射エネルギーと血液温度上昇

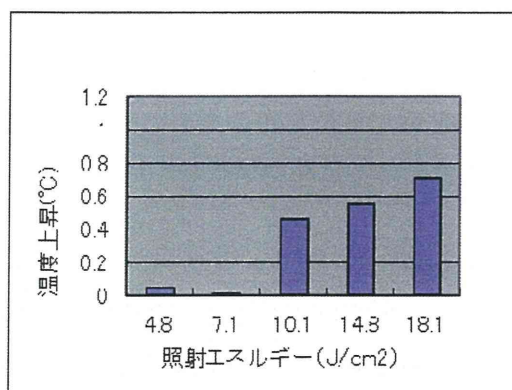


図7. パルス幅と血液温度上昇

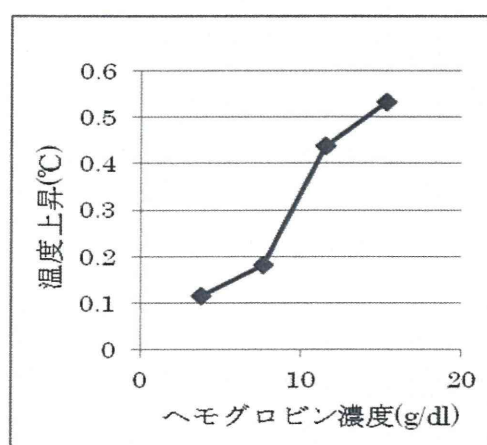


図8. ヘモグロビン濃度と血液温度上昇

表1. 人血液の生理食塩液分散液 (hBlood/Sal), 人工赤血球の生理食塩液分散液 (HbV/Sal), (hBlood/Sal) と (HbV/Sal) の混合液に色素レーザーを照射したときの温度上昇

溶液 ; 2ml, Hb10.0g/dl	温度上昇
人血液の生理食塩液分散液 (hBlood/Sal)	0.345°C
人工赤血球の生理食塩液分散液 (HbV/Sal)	0.304°C
混合液 {(hBlood/Sal) : (HbV/Sal) = 1 : 1}	0.365°C

人の血液 2ml (ヘモグロビン濃度 14.9g/dl) にパルス幅 (msec.) を変えながら色素レーザー (照射エネルギー 10.0J/cm²) を 2 回照射した結果以下のグラフ (図7) を得た。

人血液の生理食塩液分散液 (hBlood/Sal) 群に色素レーザー (パルス幅 2.0msec. 照射エネルギー 11.6J/cm²) を 2 回照射した結果以下のグラフ (図8) を得た。

hBlood/Sal (Hb10.0g/dl) 溶液 2ml, HbV/Sal (Hb10.0g/dl) 溶液 2ml, hBlood/Sal (1ml) と HbV/Sal(1ml)の混合液 2ml に, 色素レーザー (パルス幅 0.5msec. 照射エネルギー 10.1J/cm²) を 2 回照射した結果, 以下の表1 を得た. 3 群の溶液でほぼ同程度の温度上昇が観察された。

D. 考察

577 nm のフラッシュランプ励起パルス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できるのは 0.6mm 程度であるとの報告がある. また真皮上層の血管径が中程度 (38±18μm) の血管に有効であったとの報告もある. このようにレーザー治療には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い. ただそのわずかな色調改善が患者希望を担う支えにもなるため, 5年以上レーザー治療を続けている臨床例も少なくない. 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 oxyhemoglobin (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 oxyhemoglobin (赤血球) が少なく熱エネルギー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, 熱エネルギーが血管壁に効率よく伝導しないため, 治療効果が小さい.

ヘモグロビン濃度が 10.0g/dl のとき, 人血液・人工赤血球溶液・その混合液もレーザーを照射すると同程度の温度上昇が観察され, 人工赤血球にレーザーを照射することで単純性血管腫の治療に必要な熱が発生することが確認された (表1). 人工赤血球も色素レーザーの標的になりえることが分

かった。しかし、このときの吸光度を測定したが溶液の濃度が濃すぎるため吸光度は測定不能であった（図3）。

一方、ヘモグロビン濃度を 1.0g/dl に調整したとき、人工赤血球の吸光度は人血液のものを上回ることが分かった（図3・4）。しかし、この濃度の溶液にレーザーを照射しても熱の発生量がわずかなため測定誤差が大きく出やすいことが分かった（図8）。

レーザーのパルス幅の違いによる血液温度上昇の程度を測定した結果、パルス幅が短いほど高い温度上昇が確認された（図7）。

レーザーの1平方cm面積当りジュール熱の違いによる血液温度上昇の程度を測定したところ、照射エネルギーが高いほど、検体の温度上昇は大きかった（図6）。照射エネルギーが強くなると、照射直後に試験管内で溶液が小爆発することがあった。また溶液内に直径1mm程度の血液塊が発生した。これらは温度測定の誤差の原因になると予想された。レーザー照射回数の違いによる血液温度上昇の程度を測定したところ、照射回数が多いほど、検体の温度上昇は大きかった（図5）。以上、これらの実験結果からこの実験系でのレーザー照射至適条件は、波長595nmパルス幅0.5msec エネルギー10J/cm²前後 照射回数2回であり、この条件で2mlの血液が0.5℃ほど温度上昇することがわかった。次回は単純性血管腫の疾患モデルとして鶏冠を利用して生体下でのレーザー照射実験を行い、人工赤血球の効果を確認する予定である。

E. 結論

色素レーザーを人工赤血球に照射すると、人血液と同等の熱エネルギーが産生されることが分かった。難治性の単純性血管腫の治療に人工赤血球を投与してから色素レーザーを投与すると、単純性血管腫の治療成績が上がる可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

該当なし

3. Hb 小胞体の臨床応用のための医薬品医療機器総合機構における戦略薬事相談の活用

A. 研究目的

本邦で人工酸素運搬体として承認され、臨床応用された薬剤はなく、本邦で開発されたパーフルオロカーボン乳剤である FulosolDA が FDA で臨床使用を認められたことがあるにすぎない。特にヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体製剤の開発は1980年代より精力的に粉われているにもかかわらず、前臨床の段階で開発が停滞している。臨床応用を促進するために医薬品医療機器総合機構の戦略薬事相談を活用し、臨床応用へのロードマップを作成する試みを行った。

B. 研究方法

戦略薬事相談は新しい医薬品の開発に当たり、研究開発者が効率よく治験を行えるよう、医薬品医療機器総合機構が2011年7月より開始された。その目的は、開発初期からPOC試験程度までの承認申請に向けて必要な試験について、有望なシーズを有する大学・研究機関、ベンチャー企業を主な対象とし、研究・開発・薬事に精通したテクニカルエキスパートをコンサルタントとし、大学・研究機関、ベンチャー企業等との相談窓口とする。そして、相談は、テクニカルエキスパートに承認審査を担当する審査員も加えた対面で実施する。また、テクニカルエキスパートは、相談者毎に担当を決めるなどして、相談後のフォローアップも行えるようにすることである。

戦略薬事相談の説明会に引き続き第1回目の事前相談を2011年7月31日に行った。その後、開発協力企業であり、厚生労働省科学研究班の分担研究者でもあるニプロ(株)医薬品研究所のメンバーと協議を重ね、臨床応用に最も早く到達できると考えられた「腫瘍の低酸素状況を改善し、照射治療の

効果を増強する薬剤としての開発」につき大枠の開発計画を定め、8月31日に第2回目の事前相談を行った。この時点ではHb小胞体の臨床応用を早期に達成するために癌治療に用いる放射線治療の増感剤としての利用を第1に考慮して開発にあたる事が確認され、がん治療の増感剤として使用する際の問題点について検討することとなった。この時点で、原料として献血血液を使用しているために製剤となるHb小胞体が血液由来の製剤となるか、その審査に当たり、生物製剤とすべきか否かについて厚生労働省に問い合わせ、製剤製造及び審査についての対策を立てることが求められた。

以上の課題を解決するために、11月18日に厚生労働省医薬食品局血液対策課、及び薬品審査課の担当者と面談し、原料、製造の経緯から、Hb小胞体を特定生物由来製剤と考えるのが妥当で、審査も特定生物由来製剤として審査を想定して開発を進めることが妥当とのご意見をいただいた。

厚生労働省との面談結果をもってその際に指摘された事項も含め、第3回目の事前面談を12月16日に行った。そこで、臨床応用に当たっての論点整理を行い、一つ一つ対応することにより効率の良い開発を行うこととなった。その論点では、1. 特定生物由来製剤としての対応、原料としての期限切れ血液の供給方法と安全性の担保（遡及調査も含めて）、2. 現在までに粉われた生物を用いた試験のリストとその成績の評価。3. 製剤の安全性評価について各成分での評価が困難であり、最終製剤を用いて安全性評価を行うことの妥当性、4. 製剤の規格、特に無菌性の担保について検討を行うことが、対面助言に向けて必要な事項であることが明らかとなった。

C. 研究結果

a. Hb小胞体を特定生物由来製剤として開発することについて

Hb小胞体に用いるヘモグロビンは期限切れの献血血液を原料としている。われわれの用いている精製法はウィルス不活化とウィルス除去工程を含

んでおり、原料として用いるHb溶液は純粋なタンパク溶液と考えることができる。しかし、献血血液を原料としていることから、遡及調査の必要性について以前より考慮しており、供給を受けたのちに輸血製剤のラベルに記載されている番号シールを利用してヘモグロビン溶液がどの血液製剤より生成されたかを記録してきた。ゆえに遡及調査の基礎となる条件はすでに整っている。この記録を利用して、原料となる血液製剤のサンプルの長期保存、製造したヘモグロビン溶液の長期保存、製剤製造時のウィルス検証結果などの体制を整えることで遡及調査は可能となると考えられた。

b. 現在まで行われた試験リストとその成績をまとめた結果は現在までの厚労科研の成果と一致しており、下記に記した。これらの結果は非GLP下で検討したものである。現在まで多くの動物種を用いてその安全性、有効性、酸素治療薬としての可能性について検討しており、計画中の人への投与の安全性を類推できると考えられた。

c. Hb小胞体の構成成分（Hb溶液および4種類の脂質成分）を成分ごとに安全性評価を行わず、最終製剤の安全性をもって安全性試験を行うことについて検討した。精製ヘモグロビンをそのまま投与すると、比較的速やかに尿中に排泄されることが判明している。また、Hbが大量に血液中に流出する状況（急性の大量の溶血、外傷による筋肉損傷など）では腎障害や血管収縮による臓器障害・機能不全を惹起することが知られており、Hb溶液をそのまま人に投与して安全性を検証することは意味がないと結論した。脂質4成分についても同様のことが言える。脂質を大量に血中に投与すること自体が危険なことと考えられ、リポソームとして存在することにより循環血液中で機能を発揮する機能粒子であることを現在まで動物への投与により証明してきた。

さらに、リポソームの形で投与することによりヘモグロビンも脂質成分も正常な代謝経路に乗って代謝され、肝、腎、細網内皮系などの代謝系にも

大きな負荷をかけないことを明らかにしてきた。以上からHb小胞体の安全性評価はこの製剤そのものを使用した動物実験が妥当と結論した。

d. 製剤の規格、特に無菌性の確立について
Hb小胞体の製造をGMP規格に乗せることを常に意識して開発を行ってきたが、解決すべき問題として最終製剤の無菌性の保証が問題となっていた。Hb小胞体の直径は250nmであり、最終製剤に無菌濾過フィルターを用いた無菌化は不可能であることが問題であった。本研究班での検討でも最終製剤の無菌化について検討を行い、製剤となった段階から無菌化することは困難で、最終工程に入る前に無菌性の担保された原料を用いて無菌製造ラインを作成することが重要な課題であることが明らかとなった。

また、最終製剤が無菌状態であることを検証するプロセスも新たに開発する必要がある、現在その方法を検討中である。

D. 考察

Hb小胞体は動物試験では血液代替、酸素治療の双方で良好な成績を収めており、臨床応用は目前と考えられているにもかかわらず、臨床応用が足踏みをしている状況が続いている。このような状況を打破するためにPMDAにおける指導を受けつつHb小胞体の臨床応用を促進する戦略薬事相談の手法をとることとなった。戦略薬事相談は今年度から開始された新薬あるいは新薬の可能性のあるシーズの開発研究を行う研究者と企業とを結びつけ、速やかに臨床治験を行えるようアドバイスを行うシステムであり、Hb小胞体の臨床応用の問題点を明らかにし、今後のロードマップを明らかにすることが可能と考えられた。

事前面談で明らかになった問題点は多岐にわたったが、製剤が特定生物由来製剤として審査、承認が行われるとの考え方が示され、通常の薬剤の開発よりもハードルが高くなった。また、GMP工程の検証では規格の決定について、無菌製造プ

ロセスの確立の困難さが浮き彫りにされたことはこの工程の解決により多くの力を注がなければならないことが示された。また、安全性試験については現在にないカテゴリーの薬剤として評価していただかなければならないことが明らかとなった。このような結果をもって対面助言を受ける予定にしていたが、無菌プロセスの確立と無菌性の評価、安全性試験についての考察に加え、製造コストの問題とHbの歩留まりなどの問題も浮上し、現在戦略薬事相談のプロセスが停止している。

今後、企業と交渉を重ねつつ、PMDAの対面助言を得て治験へ進む体制を整えることが必要と考えられた。

E. 結論

Hb小胞体の臨床応用を目指してPMDAにおける戦略薬事相談を利用して臨床応用を促進する方針とした。3回の事前相談を経てHb小胞体を臨床応用するうえでの問題点を洗い出し、対面助言へ向けて鋭意準備を進めているが、諸事情により、戦略薬事相談の進行が停止している。今後、企業と交渉を重ねつつ治験へ進む体制を整えることが必要と考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Sakai, N. Miyagawa, H. Horinouchi, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Intravenous injection of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) after hemodilution with a series of plasma expanders (water-soluble biopolymers) in a rat repeated hemorrhage model. *Polymers Adv. Technol.* 22, 1216-1222 (2011)
2. K. Taguchi, S. Ogaki, H. Watanabe, D. Kadowaki,

- H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, T. Maruyama, M. Otagiri. Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles prevents *E. coli* growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 337, 201-208 (2011)
3. D. Takahashi, H. Azuma, H. Sakai, K. Sou, D. Wakita, H. Abe, M. Fujihara, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Nishimura, H. Ikeda. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive in ex vivo culture condition. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 337, 42-49 (2011).
 4. J. Nakajima, M. Bessho, T. Adachi, T. Yamagishi, S. Tokuno, H. Horinouchi, F. Ohsuzu. Hemoglobin vesicle improves recovery of cardiac function after ischemia-reperfusion by attenuating oxidative stress in isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 58, 528-534 (2011).
 5. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Hemoglobin vesicle as an effective blood substitute and its removal from circulating blood. *Artif. Organs* 36, 202-209 (2012)
 6. M. Yamamoto, H. Horinouchi, Y. Seishi, N. Sato, M. Itoh, K. Kobayashi, H. Sakai, Fluid resuscitation of hemorrhagic shock with Hemoglobin vesicles in Beagle dogs: pilot study. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* 40, 179-195 (2012)
 7. Sasaki N, Horinouchi H, Ushiyama A, Minamiani H. A new method for measuring the oxygen diffusion constant and oxygen consumption rate of arteriolar walls. *Keio J. Med.* (in press)
 8. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, K. Kobayashi. Effect of the cellular-type artificial oxygen carrier Hb-vesicle as a resuscitative fluid for pre-hospital treatment: Experiments in a rat uncontrolled hemorrhagic shock model. *Shock* (in press)
 9. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Hemoglobin-vesicles as a cellular type hemoglobin-based oxygen carrier. In: *Chemistry and Biochemistry of Oxygen Therapeutics: from Transfusion to Artificial Blood.* (Ed. by S. Bettati and A. Mozzarelli), Chapter 27, pp.381-390. John Wiley & Sons (2011)
- ## 2. 学会発表
1. Y. Tomita, M. Unekawa, H. Toriumi, K. Masamoto, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Horinouchi, K. Kobayashi, I. Kanno, N. Suzuki / EFFECT OF INJECTION OF ARTIFICIAL RBCS ON HEMORRHAGIC HYPOTENSION IN MICE / XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and the Xth International Conference on Quantification of Brain Function with PET / Barcelona, Spain, May 24 - 28, 2011
 2. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi / Characteristics of hemoglobin vesicles as a cellular type artificial oxygen carrier / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29
 3. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, K. Kobayashi / Fluid resuscitation using large volume of hemoglobin vesicle in rat continuous hemorrhage model (2nd report) / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29