

hemorrhagic shock model. *Shock* (in press)

8. H. Sakai, S. Takeoka, K. Kobayashi. Gas bioengineering using hemoglobin-vesicles for versatile clinical application. *Current Pharmaceut. Design* 17, 2352-2359 (2011).
 9. H. Sakai. What is the major mechanism of slower NO uptake by red blood cells? (Letter to Editorial). *J. Biol. Chem.* 286, 1e22, (2011).
 10. H.W. Kim, A. Mozzarelli, H. Sakai, J. Jahr. Academia-industry collaboration in blood substitute development. – issues, case histories and a proposal. In: *Chemistry and Biochemistry of Oxygen Therapeutics: from Transfusion to Artificial Blood*. (Ed. by S. Bettati and A. Mozzarelli), Chapter 29. pp. 413-428. John Wiley & Sons (2011)
 11. 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)
 12. H. Sakai. Artificial oxygen carriers (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics. IFMBE Proceedings 35 (5th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering 2011 (BIOMED 2011) 20-23 June 11, Kuala Lumpur, Malaysia), 845-848 (2011)
 13. T. Sato, T. Fukasawa, T. Komatsu, H. Sakai, S. Ishiwata. Protein-protein interactions in solution and their interplay with protein specific functions. *J. Phys. Soc. Jpn* (suppl.) (in press)
 14. H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics. *Current Drug Discovery Technol.* (in press)
- ## 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 / Artificial oxygen carriers (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics / The 5th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering / Kuala Lumpur / 20-23, June 2011 Malaysia
 3. H. Sakai / Artificial Red Cells (Hemoglobin-Vesicles) for a Transfusion Alternative and Oxygen Therapeutics / International Conference on Materials for Advanced Technologies. / Suntec, Singapore / 26 June-1 July, 2011
 4. H. Sakai / Hb encapsulation in vesicles retards NO- and CO-binding and O₂-release / International Society on Oxygen Transport to Tissue 2011 / Georgetown Univ., Washington DC, USA / 2011, July 24-27
 5. 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
6. N. Okuda, H. Sakai, S. Takeoka, K. Yamamoto / Influence of hemoglobin-vesicles on cultured human aortic endothelial cells in an in vitro laminar flow perfusion model / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29
7. 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
8. K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Maruyama, M. Otagiri / Pharmacokinetic properties of hemoglobin encapsulated liposome (hemoglobin-vesicle) in a hemorrhagic shock rat model / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29
9. H. Horinouchi, N. Sasaki, Y. Seishi, K. Kobayashi, H. Sakai. Influence of hemoglobin vesicle on oxygen diffusion constant of arteriolar wall in microcirculation of mouse dorsal skin window chamber / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29
10. Y. Tomita, M. Uekawa, H. Toriumi, K. Masamoto, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Horinouchi, K. Kobayashi, I. Kanno, N. Suzuki. Effect of injection of artificial RBCs on murine hemorrhagic hypotension model / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29
11. H. Sakai / Hb encapsulation in vesicles retards gas reactions by intracellular diffusion barrier and decreased diffusion of vesicles / 第49回日本生物物理学会年会 / 兵庫県立大 書写キャンパス / 2011.9.16.
12. H. Sakai / シンガポールにおける人工赤血球の研究 (WABIOSランチョンセミナー) / 第49回日本生物物理学会年会 / 兵庫県立大 書写キャンパス / 2011.9.18.
13. H. Sakai / Hemoglobin nanoencapsulation favorably retards gas reactions / 2nd anniversary symposium of Waseda Bioscience Research Institute in Singapore / Matrix, Biopolis, Singapore / 2011. 9. 29.
14. 酒井宏水 / 日本の人工酸素運搬体の歴史と現状 / 第18回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.
15. 堀之内宏久、佐々木信彦、山本尚志、小松晃之、山崎真敬、饗庭了、富田裕、泉陽太郎、山本学、勢司泰久、酒井宏水、小林紘一 / 微小循環と酸素運搬体：酸素治療への展望 / 第18回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.
16. 勢司泰久、堀之内宏久、酒井宏水、小林紘一 / ラット制御継続出血ショックモデルを用いた生理食塩分散ヘモグロビン小胞体(Hb-vesicles)の検討 / 第18回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.

17. 藤原満博、東寛、大橋乃理子、酒井宏水、堀之内宏久、小林紘一、池田久實 / ヘモグロビン小胞体のラット免疫能への影響 — 遺伝子発現プロファイルの解析 / 第18回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.

18. 酒井宏水 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の物理化学的特徴と体内酸素輸送機能 / 第3回医療化学懇談会 / 国立国際医療研究センター / 2011. 10. 31.

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：ヘモグロビン小胞体の心筋虚血 - 再灌流障害に対する保護効果

—ヘモグロビン小胞体を虚血負荷後に灌流した時の保護効果—

分担研究者：足立 健 防衛医科大学校 内科学教室 教授
研究協力者：柳田茂樹 防衛医科大学校 内科学教室 研究員
山岸 正 防衛医科大学校 内科学教室 研究員
中島 淳 防衛医科大学校 内科学教室 研究員
別所基明 防衛医科大学校 内科学教室 研究員
瀧 御幸 防衛医科大学校 内科学教室 技官

研究要旨

ラット摘出心臓をランゲンドルフ灌流し、ヘモグロビン小胞体(HbV) 30 倍希釈分散液(Hb として 0.33 g/dL)を虚血直後に 10 分間灌流した時、30 分虚血負荷後の再灌流時に心機能(左室発生圧、LVDP)の回復が見られた。これと同様の効果は、Hb 濃度を同程度に希釈したラットの洗浄赤血球を虚血直後に 10 分間灌流した時にも見られた。また、NO 合成酵素抑制剤である L-NAME や mitochondria K_{ATP} -channel の開口阻害剤である 5-hydroxydecanoate (5HD)を、それぞれ 100 μ M 濃度で同様に灌流した時にも観察された。

A. 研究目的

我々は、ラットの摘出心臓をランゲンドルフ灌流する方法を用いて、ヘモグロビン小胞体(HbV)30 倍希釈分散液(Hb として 0.33 g/dL)を虚血直前に 10 分間灌流した時、虚血-再灌流時の心機能が有意に回復することを明らかにした(1)。そして、この効果のメカニズムを解明するための様々な実験を行い、HbV が虚血-再灌流後の心筋組織中の GSSG を低下させ、蛋白質の thiol 残基の酸化を抑制し、 NO_2 content を低下させることから、HbV が虚血-再灌流で生じる nitroso-redox balance の破綻を改善することを通じて、虚血-再灌流時の心機能回復効果を示すだろうことを示唆し(2-5)、それらの結果をまとめて論文投稿した(6)。

本研究では、HbV が、虚血直後にそれを灌流した時にも、虚血-再灌流後の心機能を回復させるか否かを検討した。比較対象としては、ラットの洗浄

赤血球、NO 合成酵素抑制剤である L-NAME や mitochondria K_{ATP} -channel の開口阻害剤である 5-hydroxydecanoate (5HD)を用いた。

B. 研究方法

1. 用いた試薬類：

実験に用いた HbV は、lot 071128、lot 1006 および lot 1010 (ニプロ株式会社)である。灌流液の作製には、和光純薬の特級試薬と比抵抗 18.2 M Ω 以下の超純水を用いた。L-NAME と 5HD は、それぞれ同仁化学および Biomol (Plymouth Meeting, PA)から購入した。

2. 用いた動物、心臓灌流法および心機能の測定：

この項目での方法の基本は前報(1-5)に述べた通りであるが、以下に概略を記載する。

生後 8-9 週齢の Wistar 系雄性ラット(Charles

River Japan Inc.)を用いた。ヘパリン(ノボ・ヘパリン注 1000、持田製薬) 1000 U を腹腔内投与し、10 分後に、ネンブタール 60 mg/kg (ソムノペンチル麻酔用注射液、シェリング・プラウ アニマルヘルス社、Na-pentobarbital 64.8 mg/mL 溶液) を腹腔内投与して麻酔した。開腹・開胸して心臓を取り出し、直ちに氷冷した modified Krebs-Henseleit buffer (NaCl 116 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11.0 mM)(以下 mKH-buffer と省略する)に投入して心臓の拍動を停止させた。大動脈にカニューレを挿入し、mKH-buffer を用いて静水圧 100 cmH₂O、37°C でランゲンドルフ灌流した。mKH-buffer をはじめとする灌流液は、実験開始前から終了するまで 95% O₂ +5% CO₂ の混合ガスを通気し、pH を 7.4 に調整した。

左心室に生理食塩水を満たしたラテックス・バルーンを挿入し、圧トランスデューサー(P-50, Gould Inc.)を介して多チャンネル記録計(WS-641G, Nihon Kohden)に接続し、左室発生圧(LVDP)、左室拡張末期圧(LVEDP)、心拍数(HR)などを実験開始から終了まで連続的に記録した。バルーンの容積は、control 灌流時の左室拡張末期圧(LVEDP)が 0-5 mmHg になるようにした。control 灌流開始時から実験終了まで、心臓を灌流して出てきた灌流液を 5 分毎に採取して冠灌流量(coronary flow, CF)を測定した。

3. HbV の mKH-buffer への分散：

HbV 30 倍希積分散液：Hb 濃度 0.33 g/dL の HbV 分散液の作製法については最初の報告書(1)で詳しく述べた。概略は以下の通りであるが、実験の必要に応じて作製する総 volume は変更した。

純水約 260 mL に、832 mg の D-glucose を溶解させた。これに mKH-buffer の構成イオン成分を個別に溶解させた溶液を加え、次に HbV 原液 14 mL を加え、最後に純水で 420 mL にメスアップした。但し、NaCl 溶液の volume は、HbV 原液 14 mL

が含有する NaCl (0.9%)を差し引いたものとした。

こうして作製した HbV 分散液の Hb 濃度は 0.33 g/dL 相当となる(30 倍希積分散液)。

4. ラット洗淨赤血球(wRBC)の調製と mKH-buffer への分散：

2.での実験と同様にラットにヘパリンとネンブタールを投与後、開腹し、腹部大静脈から血液 5 mL を採取した。4°C、1570g、で 10 分間遠心分離した。血漿を捨てた後同容量の mKH-buffer を加えてよく攪拌し、同じ条件で遠心分離した。上清を捨てた後、同様に mKH-buffer を加えてよく攪拌し、同じ条件で遠心分離した。この操作をもう一度繰り返した後、沈渣の赤血球画分に mKH-buffer を加えて最終 volume を 210 mL に調製した(42 倍希積)。Wistar 系雄性ラットの血中 Hb 濃度は平均で 14 g/dL であるので、この操作で HbV30 倍希積分散液と同程度の Hb 濃度(Hb 0.33g/dL)になる。

5. L-NAME と 5HD の mKH-buffer への溶解：

L-NAME 4.3 mg と 5HD 3.4 mg を秤量し、それぞれを 160 mL の mKH-buffer に溶解させた。各薬物について 100 μM 濃度となる。

こうして作製した HbV 分散液、wRBC 分散液、L-NAME 溶液と 5HD 溶液は、37°C に加温し、95% O₂ + 5% CO₂ の混合ガスを 30 分以上通気した後実験に用いた。

6. 実験のプロトコール：

この実験のプロトコールを Fig. 1 に示した。各実験群の実験内容は以下の通りとした。

(1)control 群 (n = 5)

control 灌流を 30 分間行った後、灌流を停止させて虚血(global ischemia)を惹起し、虚血を 30 分間継続した後、再灌流を 30 分間行った。

(2)HbV 0.33 g/dL 群 (n=4)：以下 HbV 群

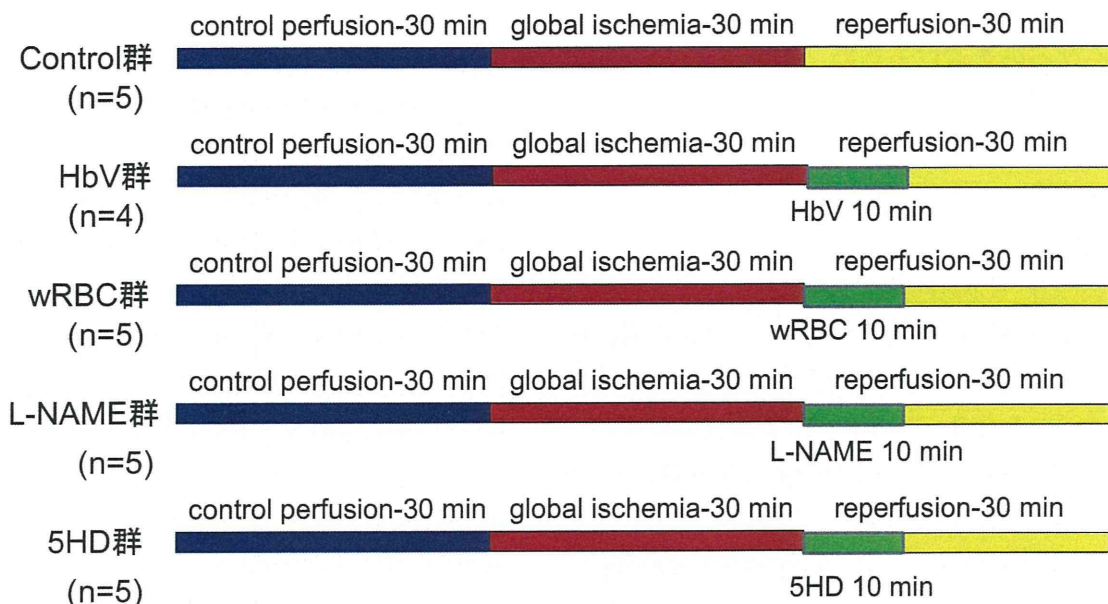


Fig. 1 実験プロトコールと実験例数

control 群と同様に、30 分間の control 灌流と 30 分間の虚血操作を行った後、灌流液を HbV 希釈分散液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、灌流液を mKH-buffer に戻し、さらに 20 分灌流した。

(3) 洗浄赤血球群 (n = 5) : 以下 wRBC 群

control 群と同様に、30 分間の control 灌流と 30 分間の虚血操作を行った後、灌流液を wRBC 希釈分散液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、灌流液を mKH-buffer に戻し、さらに 20 分灌流した。

(4) L-NAME 群 (n = 5)

control 群と同様に、30 分間の control 灌流と 30 分間の虚血操作を行った後、L-NAME 100 μ M 溶液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、灌流液を mKH-buffer に戻し、さらに 20 分灌流した。

(5) 5HD 群 (n = 5)

control 群と同様に、30 分間の control 灌流と 30 分間の虚血操作を行った後、5HD 100 μ M 溶液に

切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、灌流液を mKH-buffer に戻し、さらに 20 分灌流した。

以上の実験で用いた心臓は、 -80°C に保管した。

7. 灌流液中の lactate と pyruvate の測定 :

2.での実験で冠灌流量を測定した際、灌流液の一部を採取し、灌流液中の lactate と pyruvate の濃度を Lowry and Passonneau (7)の方法で測定した。採取した時間は、control 灌流時は虚血開始 15 分前と直前、再灌流時は再灌流 5 分、10 分、20 分、30 分の合計 6 ポイントとした。HbV と wRBC が分散した灌流液は 4°C 、10,000g で 10 分間遠心分離してその上清を用いた。

8. データの計算と統計処理 :

全ての測定項目について、各実験群で測定した時間毎に平均値(mean)と標準偏差(SD)を計算した。統計処理は、時系列分散分析を行った後、各測定時間ごとに control 群の平均値に対するその他の実験群の平均値の有意差を Dantnett 多重比較法で検定する予定であるが、例数が少ないのでまだ行っ

ていない。なお、以下で結果を図示するが、図が見にくくなるのを避けるため、標準偏差(SD)は省略した。

C. 研究結果

1. 心機能

(a)左室発生圧 (LVDP, Fig. 2)

control 群の左室発生圧(LVDP)は、control 灌流時には平均 160 mmHg で推移した。虚血負荷で LVDP はゼロとなるが、再灌流 10 分後には平均 9 mmHg、20 分後には 14 mmHg、30 分後には 22 mmHg と徐々に回復した。

HbV 群では再灌流 10 分後には平均 50 mmHg に回復し、その後も再灌流終了時まで同様に推移した。wRBC 群と 5HD 群でも、再灌流時に HbV 群と同程度の回復効果がみられたが、L-NAME 群では回復効果は少し弱いようであった。

(b)左室拡張末期圧 (EDP, Fig. 3)

control 群の左室拡張末期圧(EDP)は、control 灌流時には平均 5 mmHg で推移した。虚血開始 10 分前後から EDP は上昇を始め、虚血終了時には平均 35 mmHg となった。再灌流 10 分後には平均 95 mmHg まで上昇し、その後徐々に低下した。

HbV 群では再灌流 10 分後の EDP の上昇は軽度であったが、その後は上昇した。他の実験群、特に wRBC 群では再灌流時の EDP の上昇が軽度であるように見えた。

(c)冠灌流量 (coronary flow, Fig. 4)

control 群の冠灌流量は、control 灌流時の初めにはわずかに高かったが、その後は平均 83 mL/5 min で推移した。再灌流開始時には 50 mL/5 min まで回復したが、その後ゆっくりと低下した。

HbV 群では、control 灌流時の冠灌流量は control 群と同様に推移したが、再灌流時には時間の経過とともに灌流量が低下した。その他の実験群の冠灌流量は、実験を通じて control 群と同様に推移した。

2. 灌流液中の lactate output、pyruvate output と lactate/pyruvate (L/P) ratio

(a) lactate output (Fig. 5)

control 群の灌流液中への lactate output は、control 灌流時には平均で 0.6 mg/5 min であった。再灌流直後に、4 mg/5 min まで急上昇したが、10 分後には control 灌流時の値に戻った。

実験を行ったその他の群でも、灌流液中への lactate output は control 群と同様に推移した。

(b) pyruvate output (Fig. 6)

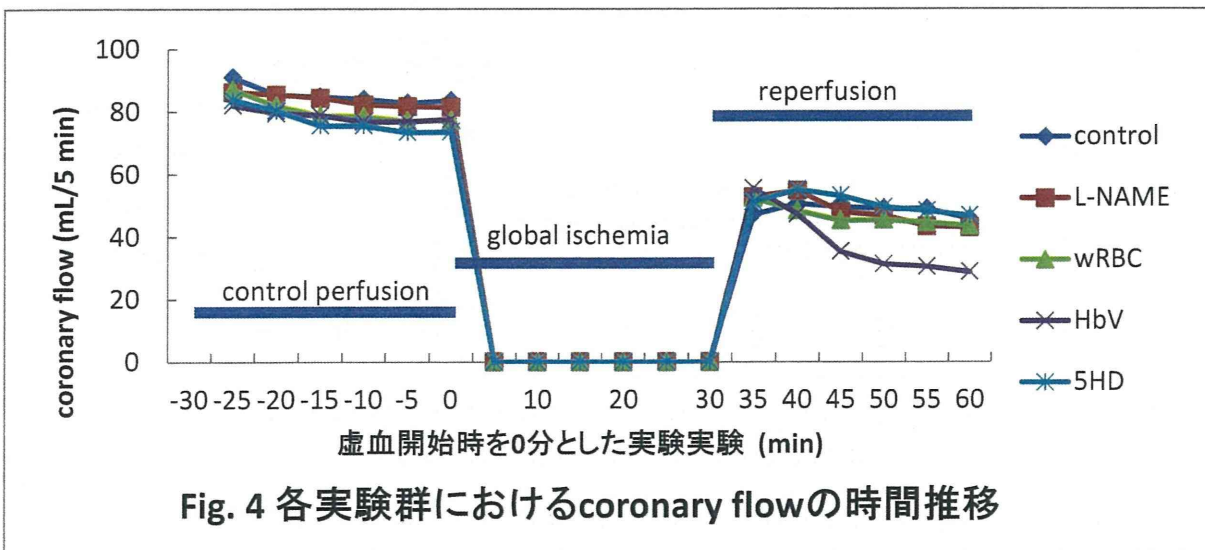
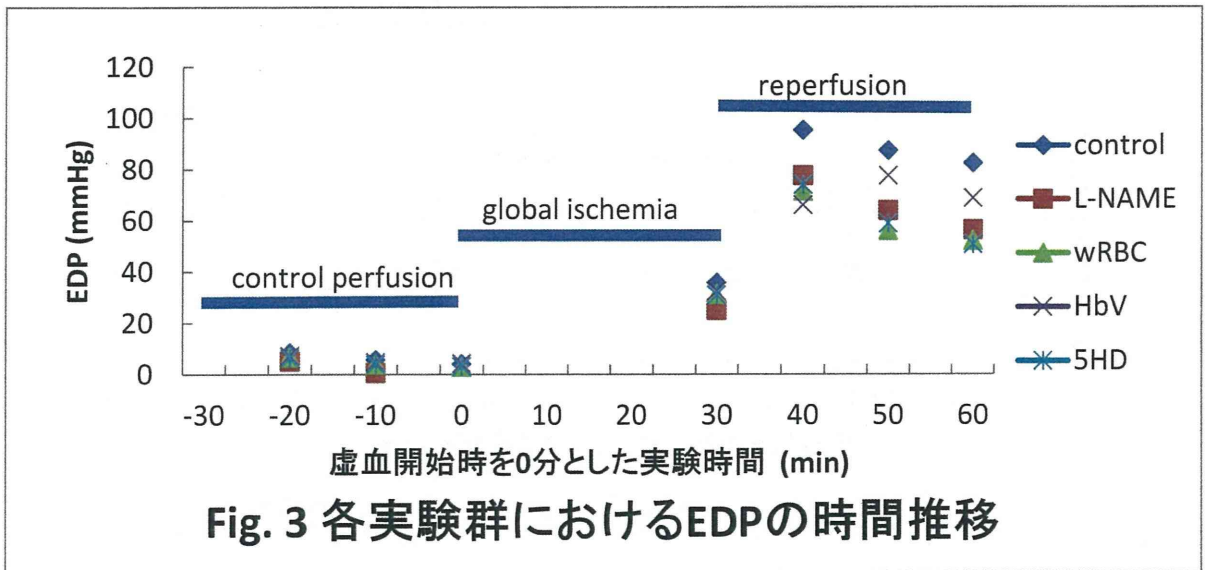
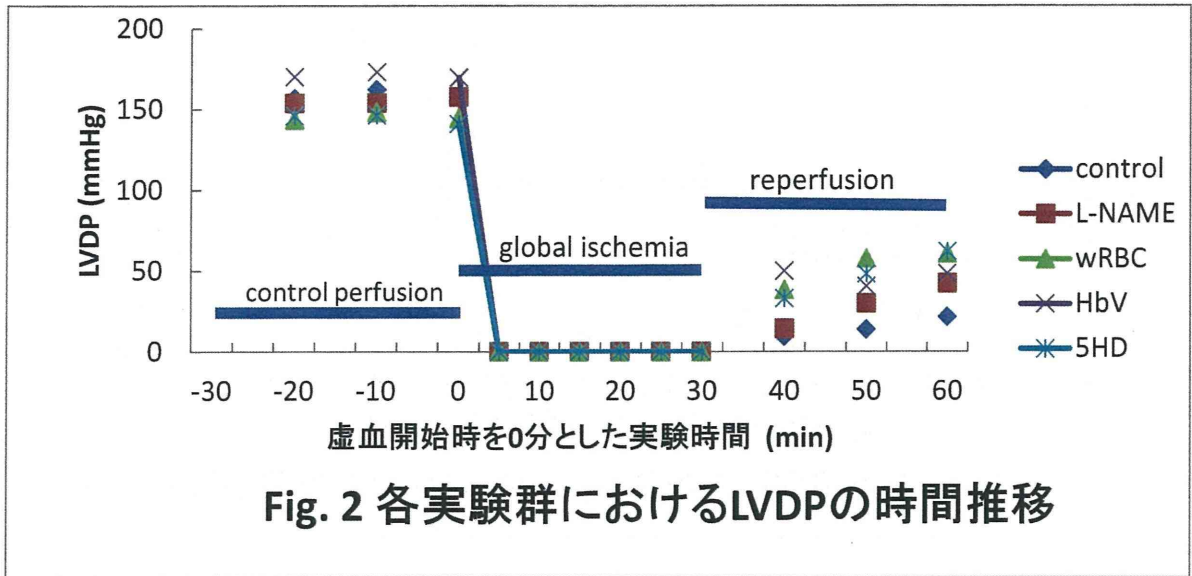
control 群の灌流液中への pyruvate output は、control 灌流時には平均で 0.12 mg/5 min であった。再灌流直後に、わずかに上昇したが、その後はゆっくり低下した。その他の実験群でも control 灌流時の pyruvate output は control 群と同様に推移した。

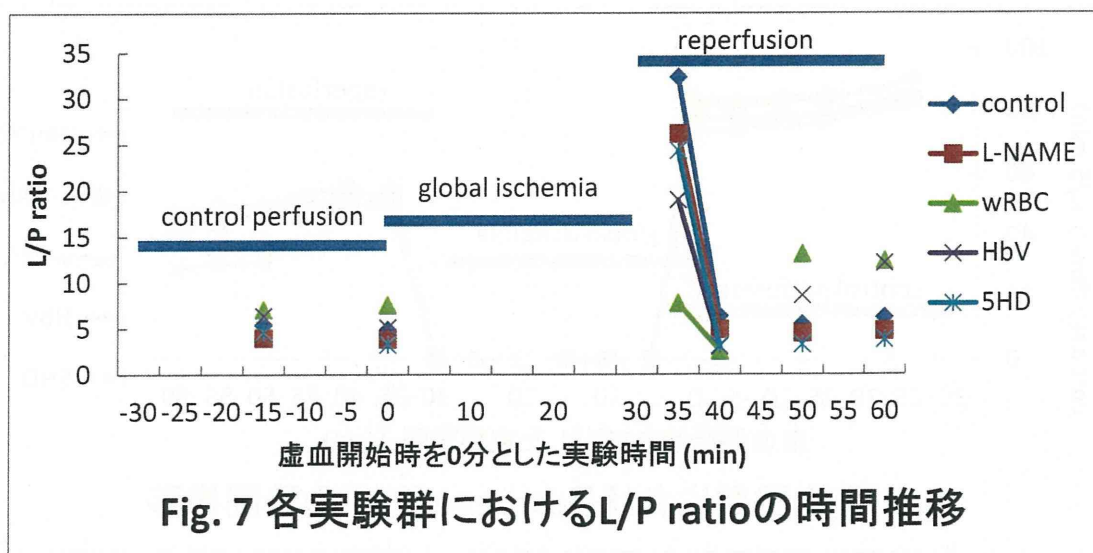
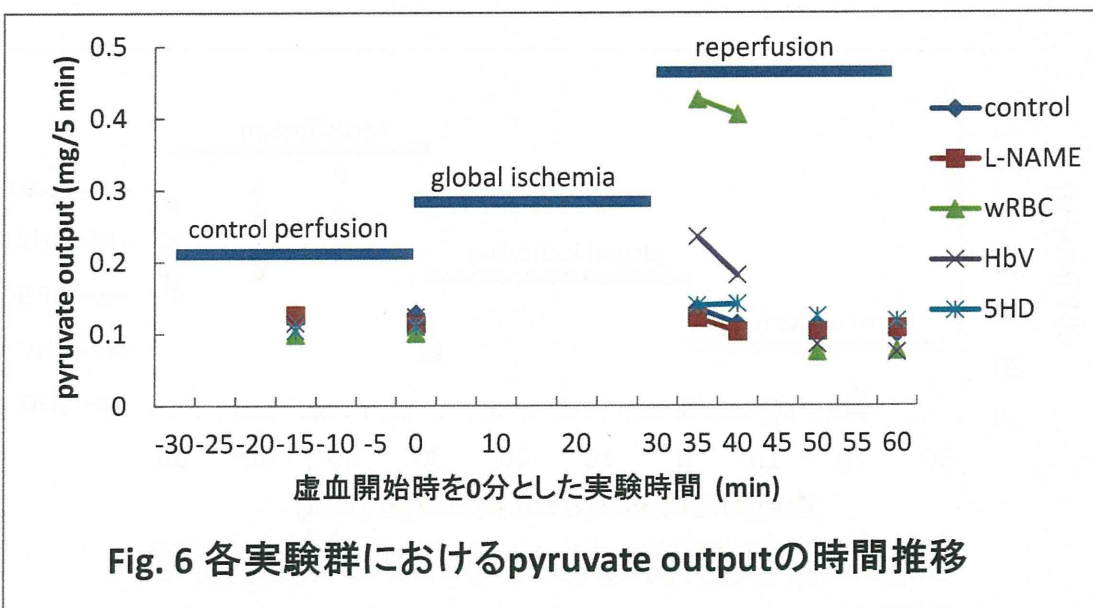
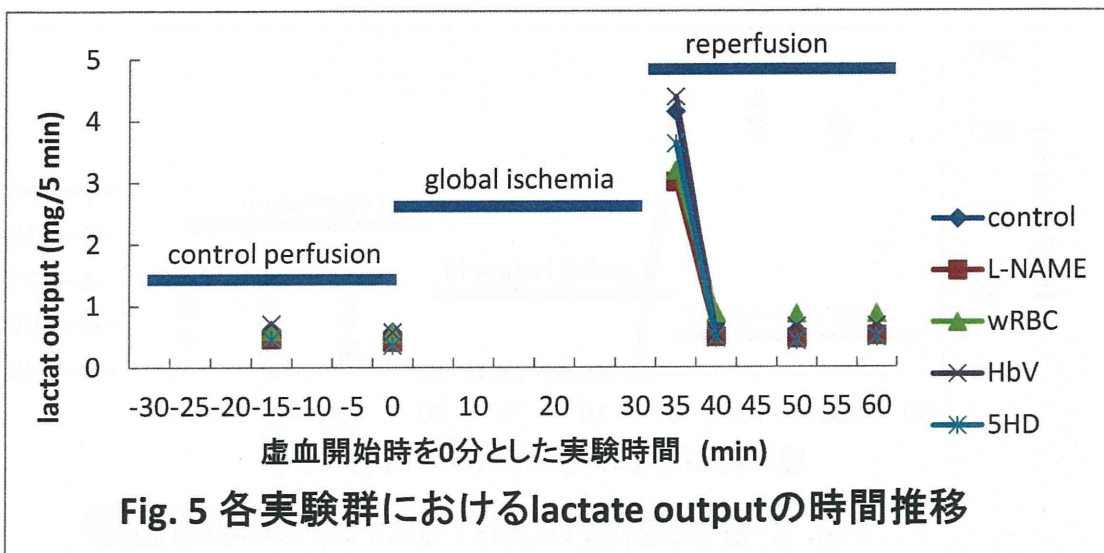
再灌流時には、L-NAME 群と 5HD 群では control 群と同様の変化であったが、wRBC 群では再灌流 5 分と 10 分で急激に増加し、その後、虚血前値に戻った。HbV 群でも、程度は弱かったが、wRBC 群と同様に再灌流 5 分と 10 分で急激に増加し、その後、虚血前値に戻った。

(c) L/P ratio (Fig. 7)

control 群の灌流液中の L/P ratio は、control 灌流時には平均 5 程度で推移した。再灌流直後には、pyruvate output がそれ程変化しなかったのに対して lactate output が急激に増加したため、L/P ratio は平均で約 32 まで急上昇した。しかし、10 分後には、虚血前値に戻った。再灌流時には、L-NAME 群と 5HD 群では control 群と同様の変化であった。

しかし、wRBC 群では再灌流 5 分でほとんど変化せず、10 分では虚血前値より低くなり、20 分、30 分には control 群よりも高い値となった。HbV 群でも、程度は弱かったが、wRBC 群と同様に再灌





流 5 分での上昇程度は低く、10 分では虚血前値より低くなり、その後、20 分、30 分には control 群よりも高い値となった。

D. 考察

今回の実験で、HbV は虚血後に灌流しても虚血-再灌流後の心機能(LVDP)回復を促進することが明らかとなった。また、今回の実験では、これまでの実験では使用しなかった wRBC を対照群の一つとして採用し、wRBC が、ほぼ同じヘモグロビン濃度で HbV と同程度の心機能(LVDP)回復効果を示すことも明らかとなった。

HbV と wRBC の心機能(LVDP)回復効果が同程度だったとは言え、その他の項目、coronary flow や pyruvate output (L/P ratio)などで微妙な差があるようにも見えた。これらの違いが、何によって引き起こされているのかは現段階では不明であり、今後の研究で解明されることが期待される。さらに、L-NAME や 5HD が、虚血後に灌流しても虚血-再灌流後の心機能(LVDP)回復を促進することも明らかとなった。これらの薬物がどのようなメカニズムで心機能の回復効果を示すのか、についても現段階では不明であるが、興味を持たれるところである。

E. 結論

ラット摘出心臓をランゲンドルフ灌流し、ヘモグロビン小胞体(HbV) 30 倍希釈分散液(Hb として 0.33 g/dL)を虚血直後に 10 分間灌流した時、30 分虚血負荷後の再灌流時に心機能(左室発生圧、LVDP)の回復が見られた。これと同様の効果は、Hb 濃度を同程度に希釈したラットの洗浄赤血球を虚血直後に 10 分間灌流した時にも見られた。また、NO 合成酵素抑制剤である L-NAME や mitochondria K_{ATP} -channel の開口阻害剤である 5-hydroxydecanoate (5HD)を、それぞれ 100 μ M 濃度で同様に灌流した時にも観察された。

(参考文献)

1. 大鈴文孝、楠原正俊、柳田茂樹、山岸正、加藤隆一、別所基明、浜御幸. Hb 小胞体の心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果. 「救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究」平成 17 年度 総括・分担研究報告書、pp.29-34 (2006).
2. 大鈴文孝、楠原正俊、柳田茂樹、山岸正、加藤隆一、別所基明、浜御幸. Hb 小胞体の心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果. 作用機序の解明-1: 心筋組織中の glucose、glycogen 濃度と解糖系酵素活性への影響「救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究」平成 18 年度 総括・分担研究報告書、pp. 38-43 (2007).
3. 大鈴文孝、楠原正俊、柳田茂樹、山岸正、中島淳、別所基明、浜御幸. Hb 小胞体の心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果. 作用機序の解明-2: mitochondria K_{ATP} -channel 活性を経由する可能性について「血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究」平成 19 年度 総括・分担研究報告書、pp. 49-54 (2008).
4. 大鈴文孝、足立健、柳田茂樹、山岸正、中島淳、別所基明、浜御幸. Hb 小胞体の心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果. 作用機序の解明-3: nitroso-redox balance を経由する可能性について「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」平成 21 年度 総括・分担研究報告書、pp. 87-96 (2010).
5. 大鈴文孝、足立健、柳田茂樹、山岸正、中島淳、別所基明、浜御幸. Hb 小胞体の心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果. 作用機序の解明-4: nitroso-redox balance と細胞内 Ca^{2+} 動態に関する蛋白質の発現「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」平成 22 年度 総括・分担研究報告書、pp. 61-67 (2011).

6. 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 hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 58, 528-534 (2011).

7. OH. Lowry, JV. Passonneau. *A flexible system of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1972:194-196.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. 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 hearts. *J Cardiovasc Pahrmacol.* 58, 528 -534 (2011).

2. 学会発表

1. 中島 淳、別所 基明、浜 御幸、足立 健、大鈴 文孝／虚血再灌流障害に対するヘモグロビン小胞体の心機能保護効果／第18回日本血液代替物学会年次大会／北海道大学医学部学友会館フラテ／2011.10.27 -28.

H. 知的財産権の出願・登録況（予定を含む）

なし

分担課題: 試料の滅菌法の開発に関する検討

研究分担者:	高野久輝	ニプロ株式会社総合研究所		
		人工臓器開発センター	センター長	
研究協力者:	菊本俊介	同	人工臓器開発センター	研究員
	田中 均	同	試験課	研究員
	加藤 洋	同	試験課	研究員
	菊地武夫	ニプロ株式会社・医薬品研究所		所長
	山根恒彦	同医薬品研究所・製材研究部		研究員

研究要旨

人工酸素運搬体(HbV)の無菌化手法の確立のため、各種滅菌法の検討を行った。滅菌法には、高温加熱する滅菌法や試料を変性させる滅菌法は用いることは出来ない。そこで新たに一般的ではないが、(1)超高压滅菌法、(2)β-プロピオラクトン(BPL)による滅菌、及び(3)銀ナノ粒子による滅菌法、更に(4)電子線照射による滅菌法を検討してきた。この結果、超高压滅菌法は、滅菌が最も困難である芽胞を形成するバチルスにも著効を奏したが、Hbを変性させることを認め、BPLと銀ナノ粒子は共にHbを変性させずに殺菌効果を発揮させた。BPLの方が殺菌効果が明確であった。電子線照射は、γ-線照射と同じく、Hbを変性させた。

A. 研究目的

人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体(HbV)は、無菌製剤でなければならないので、これまで、HbVの滅菌法の検討をおこなってきた。一般的に試料にはタンパク質のHbを含有しているため、高温加熱などHbを変性させる滅菌法は適用不可能である。

文献による血液に対する加熱の限界は、60℃を12時間まで可能と報告されている。これはHbの精製工程においてウイルスの不活化に利用されているが、微生物の滅菌にはいたらない。最終精製品の無菌ろ過は原理的に可能である。医療機器などに広く用いられているγ線照射法も試料に変性を起こすことが判明しているため、本試料には不適である。もちろんガス滅菌法も酸化性ガス(EOG, 過酸化水素、オゾンなど)を使用することからヘモグロビン生成やタンパク変性が生じて使用できなかった。

そこで、我々は、初年度(21年)及びその翌

年度(22年)に行った(1)超高压滅菌法、(2)β-プロピオラクトンによる滅菌、(3)銀ナノ粒子による滅菌法に次いで、23年度は、(4)電子線による滅菌法を検討した。

医療機器の滅菌には通常γ線照射による滅菌を行っているが、電子線による滅菌効果は、すでに広く明らかにされているので、今回はHbに対する影響に関してのみ検討を行った。電子線照射法は、γ線に比べ高エネルギーのものを発生させることが出来、短時間照射が可能となる特徴がある

B. 研究方法

ヘモグロビン小胞体(脱酸素体およびCO付加体)試料5mLをバイアルに封入したサンプルに対し、目標線量を表面5, 10及び30kGyとして10MeV電子により照射した。

1-3結論

電子線照射は、γ線と同様、人工赤血球の

滅菌には、不適切な滅菌法であった。

C. 結果および考察

ヘモグロビン小胞体(脱酸素体)は、5～30kGy照射のすべてにおいて、Hbの酸化変化を示す赤褐色への変化を認めた。また、照射前に低粘稠な懸濁液であったものが、いずれも粘稠な液(ゾル状)に変化した。

ヘモグロビン小胞体(CO付加体)では、色の変化は脱酸素対に比しやや抵抗性を示し、低線量での色変化は少なかったものの、30kGy照射においては脱酸素体と同様の変化を示した。また液状の変化は5～30kGy照射のすべてにおいて脱酸素体と同様であった。

CO付加体での色変化の抵抗性から、電子線の効果は、ラジカル発生による酸化的なタンパク質等への攻撃であることが改めて認識される。医療機器における電離放射線照射による滅菌は30kGy前後の照射が目安となって

おり、この線量で変化が見られたことから、CO付加体としてヘモグロビンの安定性を高めても有効でないことがわかった。

HbVへの電子線照射により懸濁液がゾル状にかわるなどの外観上の変化したことから、ヘムの酸化、タンパクの変性だけでなく、リポソームを構成する脂質成分へも影響した可能性は十分にある。

D. 結論

電子線照射は、 γ 線と同様、人工赤血球の滅菌には、不適切な滅菌法であった。

HbVの新しい滅菌法は、開発し得なかった。

E. 研究発表

なし。

F. 知的財産権の出願。登録状況(予定を含む)

該当なし

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方法の策定と GMP 製造技術の確立

分担課題：Hb 小胞体の GMP 製剤製造方法の確立

分担研究者	菊地 武夫	ニプロ株式会社	医薬品研究所	研究所長
研究協力者	山根 恒彦	ニプロ株式会社	医薬品研究所	研究部バイオ・生物評価研究室
	松田 健作	ニプロ株式会社	医薬品研究所	研究部バイオ・生物評価研究室
	山本 尚志	ニプロ株式会社	医薬品研究所	研究部バイオ・生物評価研究室
	岸田かおり	ニプロ株式会社	医薬品研究所	研究部製剤第一研究室
	甲斐 俊哉	ニプロ株式会社	医薬品研究所	

研究要旨

(1) 保存中のメトヘモグロビン生成の防止は Hb-V の機能維持のため重要である。昨年度報告に続き製造最終段階で脱酸素化した Hb-V について、新たなロットも含め最大 48 週まで保存安定性を調べた。室温および冷蔵保存した時のメトヘモグロビン化率の推移をみると、いずれも初期値（4～8%台）と比べて 3%の範囲内で測定値が変動するにとどまり、上昇傾向は見られず、10%を超えることもなかった。このことから、十分な脱酸素化が長期の保存安定性に有効であることが確認できた。回顧的な製造実績の評価から脱酸素化工程における品質安定化のための要因を挙げた。

(2) Hb-V の製造方法全般について生産性、品質および安全性の向上などの観点から今後の製造工程や設備設計に必要な事項を以下取り上げ考察した。ヘモグロビンの精製工程では、期限切れ赤血球製剤の供給の不安定さ、品質保持の困難さを吸収し、精製工程の安定化と長期貯留保管の組み合わせについて考察した。製剤工程では無菌保証に関する留意点に付いて述べた。

I. メトヘモグロビン化の推移を指標にした Hb-V の保存安定性

A. 目的

Hb-V 中のヘモグロビンが機能するためには、その酸化つまりメトヘモグロビン化を防止する必要がある。脱酸素化した製品の安定性を保管中のメトヘモグロビン化の推移として、昨年に引き続きさらに製造ロット数を加え、保存期間も延長して調べて、初期値や保存温度の影響などを考察した。

B. 方法

1. Hb-V の調製と保存

脱 CO 化後の Hb-V を窒素気流下（流量約 20 L/hr）において約 10 時間攪拌しながら脱酸素化した。これを同じく窒素気流下においてガラスバイアルに充填し、ブチルゴム栓にて封栓した。これらの充填サンプルを成り行き室温（約 25℃）および冷蔵（2～8℃）に保存した。サンプリングの際には環境中の酸素の影響を最小となるよう、窒素気流下（酸素濃度 0.1%未満）にてバイアルより Hb-V を抜き取った。なお、これら Hb-V 懸濁液中には抗酸化（還元）作用のある成分はどの工程中也添加していない。

2. Hb-V のメトヘモグロビン化率の測定

62 mg/L n-オクチル-β-チオグルコシド溶液を等量添加して Hb-V を可溶化した。この溶液につきシアノメトヘモグロビン法によりメトヘモグロビン化率を求めた。

C. 結果及び考察

脱酸素環境下ガラスバイアルに充填したサンプルのメトヘモグロビン化率の推移を図 1 に示した。

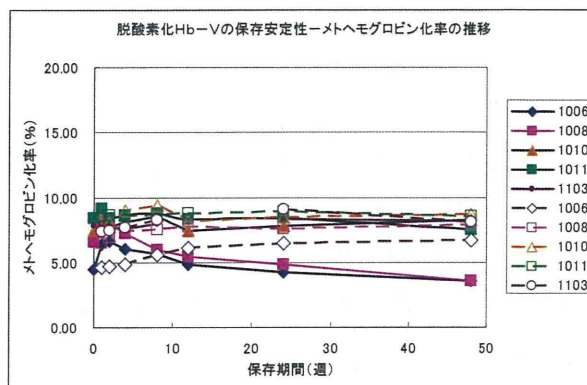


図 1 脱酸素化 Hb-V の保存安定性
—メトヘモグロビン化率の推移

室温（クローズドシンボル）および冷蔵（オープンシンボル）に保管した時のメトヘモグロビン化率を示す。

昨年度に比べロット数も増やしメトヘモグロビン化率の初期値に幅のあるロットについて、より長期（48 週まで）の安定性を調べることが出来た。各初期値は、4～8%台であり、このあたりが現状の製造品質を反映した値と考えられる。このメトヘモグロビン化率は初期値にかかわらずその後の経過には大差が無く、48 週後にいたるも 2～3%の範囲内で測定値が変動するにとどまっていた。保存温度による違いはなかった。

長期間にわたる分析のばらつきも考慮するとこれらの数値の違いは本質的な差異ではなく、10%を超えるような変化はなかったことから、今回の製造ロットでは十分に酸化防止できていたと考えられる。

すなわち、一度脱酸素化が達成されると保存中のメトヘモグロビンの生成は室温に置いてもしっかり抑えられ、保存安定性の点では酸化防止剤などは必ずしも必要としないと考えられる。

なお、初期のメトヘモグロビン量の違いはその後の推移には直接影響しないというものの、より低値であることが好ましいことはいうまでもない。メトヘモグロビン化率の初期値を低減し脱酸素化工程の再現性を高める要因をこれまでのサンプル調製の実績（これには不成功事例も含む）から回顧的に探った。以下の項目に留意

が必要と考えられる。

すなわち、品質に関する製造条件・要因として、ロットサイズ（気液界面の大きさ）、攪拌、液温、通気流量、時間、反応容器外部の環境中酸素、前工程（脱CO工程）でのメトヘモグロビン化率、原薬の保存期間、接液する樹脂素材（とくにシリコン）中の残留酸素、容器充填環境の酸素分圧などが挙げられる。

II. 製造方法

A. 目的

Hb-V の製造方法全般について生産性、品質および安全性の向上などの観点から今後の製造工程や設備設計に必要な事項を以下取り上げ考察した。

表1 ヘモグロビン精製収率の実績

ロット	0921		0931		0951		0961		0971
	A	B	A	B	A	B	A	B	—
期限切れ赤血球	100	100	100	100	100	100	100	100	100
血球洗浄	93.7	93.4	79.5	82.5	66.9	75.7	68.6	69.1	64.3
ストローマ除去	83.7	83.5		72.9	68.9	70.1	66.8	61.6	51.4
CO化	83.5	82.4	71.3	71.8	68.0	68.4	65.6	60.5	50.5
ウイルス不活化(加熱)	78.7	76.0	69.1	67.7	64.9	64.9	61.3	52.9	48.0
ウイルス除去膜処理	77.3		67.0		64.9		57.5		48.2
脱塩・濃縮	76.9		65.7		63.9		54.4		41.9
最終ろ過(0.2μm)	71.3		60.7		58.3		50.5		36.0

赤血球製剤の130～170単位を1バッチとして洗浄処理からウイルス不活化処理まで行った後2バッチを1ロットに合一して、ウイルス除去膜にかける。ただし、受け入れ製剤量が少ないときには前半の1バッチで最終1ロットを構成する。

初発の赤血球製剤の総ヘモグロビン量を100%として各工程の収量を収率にて示した。

このうち、気液界面の大きさは処理液量の影響がもっとも出やすく、これがスケールアップファクターの最大の要因となる。

B. 方法

期限切れ赤血球製剤の受け入れ・保管からヘモグロビン精製品を得る工程およびHb-V製剤とする工程を検討対象とした(図1参照)。これまでの製造実績を集約し、目的にあげた生産性、品質および安全性の向上の観点から留意すべきポイントを抽出し。

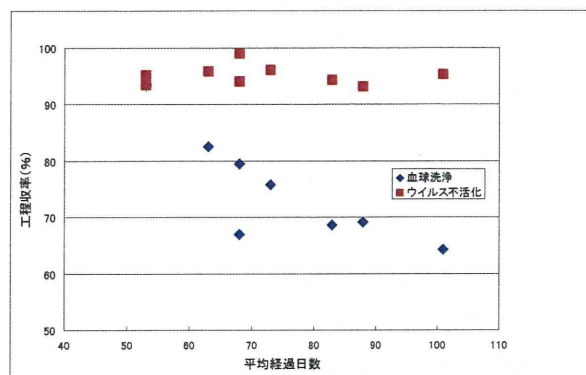


図2. 期限切れ赤血球製剤の保存期間と工程収率

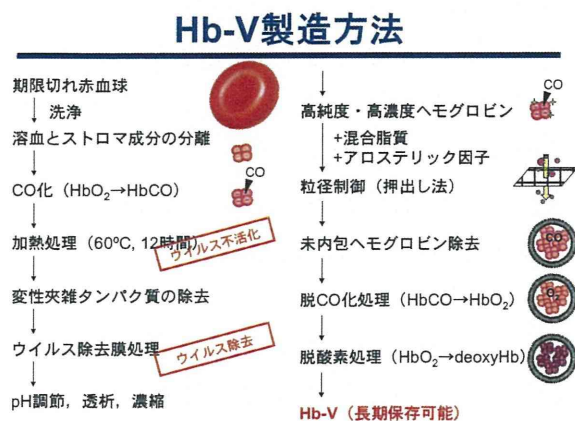


図1. Hb-Vの製造フローの概略

C. 結果及び考察

1. 精製工程

(1) 工程収率

表1に赤血球の洗浄から精製ヘモグロビンの精製までの収率の典型的な実施例を最初に仕込んだ赤血球製剤中のヘモグロビン量を100%として示した。一見し最終ヘモグロビン量に2倍ほどの大きなロット間差があることがわかる。しかし、詳細に見ると工程ごとのヘモグロビン回収率には、赤血球の洗浄を除いてロット間差はあまりなく、むしろ安定していた。

この要因を調べたところ、期限切れ赤血球製剤の保存期間が相関していることがわかった。

最初の工程である血球洗浄とヘモグロビンに最も負荷をかけるウイルス不活化(加熱処理)とで工程収率を比較し、この状況を示したのが図2である。前者は赤血球製剤の保存期間が長くなるに従い低下しているが、後者は期限切れ赤血球製剤の保存期間にかかわらず高い収率で安定していることがわかる。赤血球は冷蔵保存中に細胞内ATPレベルが低下し細胞膜が脆弱化することが知られているが、古い赤血球は洗浄の機械的刺激に耐えられなかったためと考えられる。

このように全工程を通してのヘモグロビン収率はこの洗浄工程での収率によってほぼ決まると考えられた。他ロットも含めた実績を見ると期限切れ後およそおおむね3ヶ月、のぞましくは採血から2ヶ月以内をひとつの目安に、洗浄処理を行うことが収率の安定には望ましいことがわかった。

ここに、入手可能な量に変動の大きい期限切れ赤血球製剤を有効に活用し、一方で製造工程を安定させるための設備設計上の要件が見て取れる。少なくとも赤血球洗浄の工程は小さいユニットを複数列用意し、期限切れ赤血球製剤必ず一定の保存期間内に処理を終え、後工程でロットサイズを大きくすることが良いと思われる。

(2) 長期貯留保管

精製ヘモグロビンはヒト血液に由来すること

から薬事法上の扱いは「特定生物由来製品」に該当するものと考えなければならない。その製造工程では、感染性因子とくにウイルスに留意してすでに技術的に確立した不活化・除去の工程が組み込まれたフローとなっている。これらの処理は他のバイオ医薬品に準じたものといえるが、血漿分画製剤の必要要件を参考にしてリスク管理を考えると長期貯留保管（採血から6ヶ月以上の原料保管）を工程に組み込むことが必要となろう。前記のように赤血球製剤のままの長期保存はまったく現実性がない。そこでどのように組み込むかこの点について考察した。

現製造方法の特徴は、一酸化炭素（CO）を付加することによりヘモグロビンの熱力学的な安定性を向上させ、ウイルス不活化にもっとも確度の高い加熱処理を可能とし、さらに精製後長期間の保存をも可能としている点にある。

このことを踏まえると、CO付加後の加熱処理前後の段階で一旦工程を止め、長期間保存することが第1案として考えられる。加熱処理時の均一性を考慮するとここでのバッチサイズもあまり大きくせず、この次工程以降でバッチ混合するほうが製造管理や品質管理面でもよいと考えられる。

第2案には、まだ技術的な検討を要するものの、洗浄済み赤血球の凍結保存も考えられる。凍結融解での溶血は後工程に本質的な影響がないことと、最近のバイオ医薬品製造用のタンパク質溶液の凍結融解システムなどを念頭に置けば十分に可能性はあるであろう。

2. 製剤工程

Hb-Vの製剤化において最も大きな課題はその無菌性保証にある。すでにリポソーム製剤は少なからず上市されているが、これらに比べ、Hb-Vは、有効成分（タンパク質）、脂質組成・濃度、粒子径などの製剤上の特性から、リポソーム調製後に無菌化することが困難となっている。またこれまであまり指摘されてこなか

ったが、無菌性に関する評価方法、たとえば無菌試験なども常法のままでは適応しがたく、工程の評価もままならない。

これまでに十分な解決方法が見出せたとは言いがたいが、いくつかの点についてその方向性を示したい。

Hb-V製剤は、最終滅菌が困難であることから、ヘモグロビン溶液への脂質の添加前にそれぞれの無菌化をはかり、後工程を無菌操作および完全閉鎖系にて組み立てる以外にない（図3）。

ヘモグロビン溶液の場合、濃度やpHの調製後に無菌ろ過操作を組み込むことができる。タンパク質濃度が非常に高いので、バリデーションとしての微生物負荷試験においては試験の成立のため細部に押さえるべき点もあるが、原理的に問題は少ない。

なお、pH調製には粘度のある高濃度タンパク質溶液にNaOH溶液を添加するため、タンパク凝集が生じやすく、この操作法を十分に標準化しておかないと、直後のろ過操作に破綻をきたす可能性が小さくない。ゆとりのあるフィルター面積の設定とプレフィルター導入なども無菌ろ過の再現性確保には必要となる。このような製造管理上の配慮がロットごとの無菌性担保に重要である点は意識すべきである。

リポソーム原料の脂質も製剤ごとの脂質組成物が無菌原料として供給されることはまだ一般的ではない。Hb-V製剤のようにやや特殊な脂質組成では、製剤化の準備工程において無菌化調製を行う必要がある。

脂質単独の場合、有機溶媒に溶解し無菌ろ過が原理的にも可能であるが、ヘモグロビン溶液との混合は乾燥粉体を添加するため、脂質も一旦乾燥する必要がある。幸い最近では、特殊とはいえ、無菌的なスプレードライ装置や凍結乾燥用のディスパーザブルトレイなども見られるようになった。無菌脂質粉体を得る方法論が現実な

ものとなっている。

Hb-V製造工程

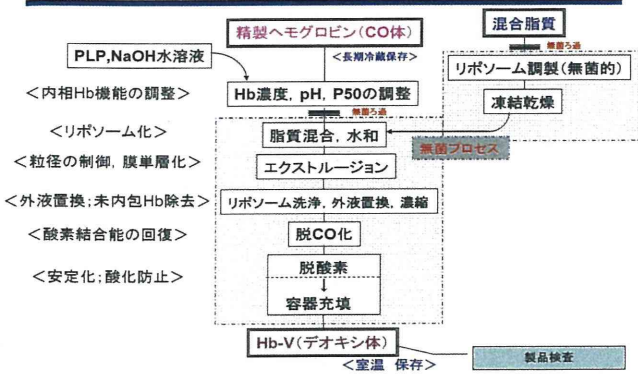


図3. Hb-V製剤化工程

最近ではアイソレーター技術などの進歩により無菌環境や完全閉鎖系の工程組み立ては設備上も現実的なものとなっている。無菌保証の点では、操作時の環境やリポソーム洗浄液などプロセス液について、一般的な注射剤よりも緻密で重層的な微生物評価をロットごとに同時的に実施することが必要となる。

なお、環境の無菌化には、最近では過酸化水素や二塩化炭素などの酸化性ガスによる滅菌方法が多く利用されるようになってきたが、これらの成分はわずかながら設備のHEPAフィルターやコーキングなどの素材、さらに樹脂製の送液チューブ素材などには残留することがある。通常の薬物であれば問題とならない微量でも、デオキシ化されたヘモグロビンは非常に酸化されやすいので、微量の酸化性成分によるメトヘモグロビン化のリスクがあることには十分な注意が必要である。脱CO化工程以降は容器充填まで閉鎖系とする設備仕様とすることが必要となろう。

微生物評価法について述べる。Hb-Vのリポソームは非常に安定で濃度の高い懸濁液であるため、一般的な無菌試験であるメンブランフィルター法は困難であった。微生物に影響の少ない可溶化(界面活性剤, 超音波処理など)も種々試みたが、残念ながら満足の得られる条件は見出せなかった。

無菌試験は抜き取りサンプルにより非常に低い汚染レベルを調べるため本質的に感度が不十分で、この結果のみでロットの品質評価を行うことに無理があることはよく認識されている。そのため、最近では工程の微生物環境や滅菌操作に関するパラメーターがますます重要視されている。前述の重層的な工程評価の指摘はこれと関連したものである。

それでもなお製品やプロセス液の直接的な微生物評価法は不要とはいえない。そこで調べた範囲では、直接法による無菌試験法が限定的であるものの現在実施可能な手法として考えている。これは液体培地(100mL)へのHb-V懸濁液(10mLを上限)の直接添加によるものである。添加と同時に濁るため、培養期間中液面上の変化以外では微生物発生を捉えることは難しい。そこで一定期間後、培地の一部(1~5mL)をさらに新鮮培地に植え継ぎでから判定を行う。リポソーム内部の評価のほか、検出感度、所要時間、検出可能な微生物などまだ検討の余地が少なくないが、一定の評価が得られよう。

また、いまだ公定書収載には至っていないが、最近開発されている手法(たとえば、微生物の増殖に伴うCO₂発生の検出など)もとくに工程中の評価には有望であろう。いずれにしても、どの方法も限界があることを理解したうえで、組み合わせにより製造工程の評価を行うことがこのHb-V製剤の製造には必要となる。

D. 健康危険情報

該当なし

E. 研究発表

山根恒彦, 山本尚志, 松田健作, 菊地武夫, 高野久輝, 小林紘一 / リポソーム化ヘモグロビンの臨床研究へ向けて その品質保証(製造法, 品質および安全性)のレギュラトリーサイエンスからの

考察) / 第 18 回血液代替物学会年会シンポジウム 該当なし
/ 北海道大学医学部学友会館フラテ /
2011. 10. 27-28

F. 知的財産権の出願, 登録情報 (予定含む)