

Table 1 (Product Bioburden + *Staphylococcus aureus* ATCC 6538)

Concentration of BPL (%)	Surviving Microorganism in LEH (CFU/mL)	Log Result of Surviving Microorganism	Total Product Bioburden (CFU/mL)	Log Result of Product Bioburden	Log Reduction	Remarks
0.000	9.75×10^8	8.99	9.75×10^8	8.99	0.00	Surviving Microorganism in LEH is derived from test report SN-2012-0689.
0.025	1.04×10^8	8.02			0.97	N/A
0.050	7.17×10^5	5.86			3.13	N/A
0.075	1.37×10^3 ^b	3.14			5.85	< LOQ ^a
0.100	2.00×10^2 ^b	2.30			6.69	< LOQ ^a

^a Limit of Quantification (LOQ) = 30 CFU/plate

^b The results were calculated based on the observed count at selected dilution

Table 2 (Product Bioburden + *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027)

Concentration of BPL (%)	Surviving Microorganism in LEH (CFU/mL)	Log Result of Surviving Microorganism	Total Product Bioburden (CFU/mL)	Log Result of Product Bioburden	Log Reduction	Remarks
0.000	9.75×10^8	8.99	9.76×10^8	8.99	0.00	Surviving Microorganism in LEH is derived from test report SN-2012-0689.
0.025	9.23×10^7	7.97			1.02	N/A
0.050	1.91×10^5	5.28			3.71	N/A
0.075	< 1.00×10^2	< 2.00			> 6.99	< LOD ^c
0.100	< 1.00×10^2	< 2.00			> 6.99	< LOD ^c

^c Limit of Detection (LOD) = 1 CFU / plate (1.00×10^7 CFU/mL after the calculation)

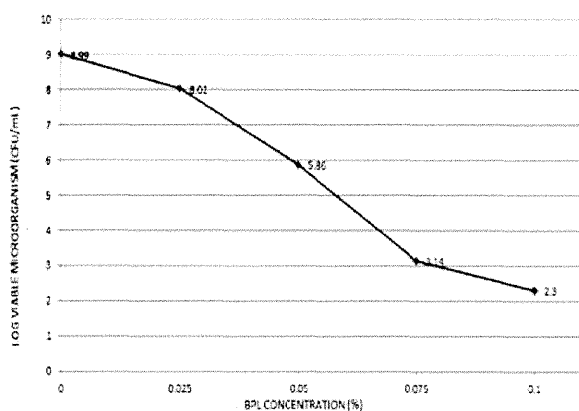


Fig.1 - The effect of different BPL concentrations on product bioburden + *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 in LEH at 37°C

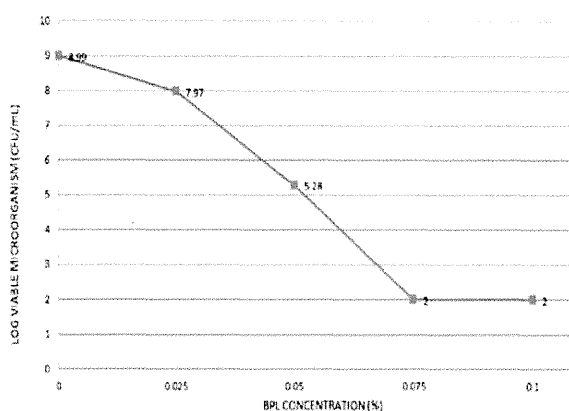


Fig.2 - The effect of different BPL concentrations on product bioburden + *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 in LEH at 37°C

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BRASS Pte. Ltd. (33 Ubi Ave 3, #06-13/14, 27-29 Vertex, Tower B, Singapore 408868)にて実施した。

(検体)

Hb小胞体分散液(Lot 22-Feb-2013)

(菌体)

Bacillus subtilis spores ATCC 6633

2.49×10^6 CFU/0.1 mL

Table 3 *Bacillus subtilis* spores ATCC 6633)

Concentration of BPL (%)	Surviving Microorganism in LEH (CFU/mL)	Log Result of Surviving Microorganism	Concentration of Microorganism in LEH (CFU/mL)	Log Result of Microorganism in LEH	Log Reduction
0.000	2.62 X 10 ⁵	5.42	2.49 X 10 ⁵	5.40	-0.02
0.025	2.64 X 10 ⁵	5.42			-0.03
0.050	2.26 X 10 ⁵	5.35			0.04
0.075	1.83 X 10 ⁵	5.26			0.14
0.100	1.29 X 10 ⁵	5.11			0.29

C. 結果

1. β-プロピオラクトンの殺菌効果の検証 (Test No. SN-2012-0651)

Staphylococcus aureus に関する結果をTable 1 およびFigure 1左に、また*Pseudomonas aeruginosa* に関する結果をTable 2およびFigure 1右に記す。いずれもHb小胞体へのBPL添加濃度が上昇するにつれ、死滅効果が得られ、BPL濃度0.100%のとき、Log reductionが6.69, および>6.99が得られた。従って、BPLにより十分な殺菌効果があることが確認された。(但し、今回用いた試料Lot 21-Nov-2012は、無菌化が保証されたものではなく、接種した菌体数よりも多く菌体が存在していた。)

2. β-プロピオラクトンの芽胞に対する効果の検証 (Test No. SN-2013-0103)

芽胞(*Bacillus subtilis* spores ATCC 6633)に関する結果をTable 3に示す。Hb小胞体へのBPLの添加量を増大させるにつれ、残存菌体数は減少傾向が見られるものの、BPL添加量が0.100%のところ、Log reductionは0.29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。

D. 考察

β-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、バクテリアやウイ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。今回の実験では、*Staphylococcus aureus* および*Pseudomonas aeruginosa*の添加系においては、BPLの十分な殺菌効果が見出され、これは従来我々が報告した傾向と一致しており、今回別施設で実施した結果の再現性が得られたことになる。しかし、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、煮沸は出来ないが、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。

今回の結果から、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、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。

5. ヒト血液由来ヘモグロビンを用いないヘモグロビン小胞体の製造の検討

A. 研究目的

現行の人工赤血球の製造に用いているヘモグロビンは、日本赤十字社から提供を受けた期限切れ献血血液から精製をしている。献血血液は緊急時に備えてある程度余分に備蓄すべきであり、従って期限切れ献血血液が無くなることはあり得ないと考えられる。しかし、需給バランスの見直しや保管データ管理によって、期限切れとなる量が低下することは確実である。従って、ヘモグロビンの

元となる原料をヒト血液以外に求めることも考えておく必要はある。家畜由来の血液を用いることができれば、供給量には問題は無くなると考えられる。

我々は以前に新鮮ウシ血液からヘモグロビンを精製し、これをもとにHb小胞体が調製できることを確認した(Sakai et al., 2002)。しかし狂牛病の問題から、ウシを含む反芻動物由来の生物材料を用いる製剤の開発には困難を伴うことが予想される。さらに、ウシ由来の成分を用いる製剤について、宗教的な問題もありうる。

そこで本研究では、ブタ由来ヘモグロビンを用いることを検討した。ブタ由来の成分を用いる製剤についても、宗教的な問題はありうると考えられるが、反芻動物では無いので、プリオンに関する問題は回避できると考えられる。

B. 方法

1. ブタ血液からのヘモグロビン精製

EDTA加ブタ新鮮血は、Innovative Research Inc. (Michigan, USA)より購入した。総量1004g ([sHb]=10.78g/dLを先ず、250 mL遠心チューブに分配し、遠心分離(3000 rpm, 20 min)処理し、上澄みを除去した。沈降した赤血球は再度生理食塩水で再分散した。この操作を4回繰り返し、洗浄濃厚赤血球を得た。これを2Lのパイレックス硝子容器にいれ、純水を加えて1.5Lとした。タンジェンシャルフロー限外濾過システム Biomax V-screen (cutoff Mw. 1000 kDa, Millipore)を用い、溶血とストロマ成分の除去を同時に行ない、sHb溶液を得た。sHb溶液(オキシ型)は、一酸化炭素ガスを通気することによって、カルボニルヘモグロビン(sHbCO)に変換した。sHbCO溶液を60℃にて一晩(15時間)インキュベートしたのち、氷水で冷却し、3000 rpmで30分遠心分離する操作を二回繰り返し、変性不溶化した夾雑蛋白質を除去した。透析と濃縮をタンジェンシャルフロー限外濾過システム Biomax V-screen (cutoff Mw. 8kDa, Millipore)を用いて行なった。塩

濃度が0.01%以下になったことを確認したあと、sHbCO濃度42g/dLまで濃縮した。

2. sHb小胞体(sHbV)の調製

調製法は従来法に従った。ピリドキサル5'-リン酸(PLP)を、精製濃縮sHb溶液に対し、PLP/sHb = 0, 0.5, 1.0, 2.5の比で添加した。孔径0.45 μ mのフィルタ(Advantec Co.)を透過させたあと、混合脂質粉末(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG₅₀₀₀-DSPE=5/4/0.9/0.03モル比)を添加、混合し、粒径制御を行った。外水相の未内包Hb溶液を除去し、可視光照射によって一酸化炭素を除去し、オキシ体に変換した。Hb濃度はシアノメトヘモグロビン法(Alfresa Parma Co.)の変法にて、またリン脂質濃度はコリンオキシダーゼ-DAOS法(和光純薬)の変法により測定した。最終的にsHbV分散液のHb濃度を10g/dLに調節した。粒子径は光散乱法にて測定した(Nanoparticle analyzer SZ-100, Horiba Ltd)。

3. sHb溶液の熱的安定性に関する分析

オキシ型、デオキシ型、カルボニル型sHb溶液の耐熱性について、示差走査型熱量計(DSC8500, Perkin Elmer Inc.)を用いて分析した。Hb溶液(10g/dL, 60 μ L)をステンレス製微小カプセルに封入し(Large volume capsules, LVC, Perkin Elmer Inc.)、昇温時の水の蒸発の影響を最小限にした。30°Cから120°Cまで、昇温速度1.0°C/minでスキャンした。

4. sHb溶液およびsHbVの酸素平衡曲線の測定

sHbCO溶液を生理食塩水で稀釈して2.5g/dLとし、酸素気流下、可視光照射してオキシ体に変換した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4, Gibco)または30 mMリン酸緩衝液(PB, pH7.4, Cl⁻イオンなし)に稀釈して測定を行なった。PLP内包量の異なるsHbVについては、ヘモックス緩衝液に分散させた。ヘモックスアナライザー(TCS Scientific Corp)を用いて酸素平衡曲線を測定した。

5. sHbおよびsHbVの自動酸化速度の測定

sHbV およびsHbVをPBS(pH7.4)に分散させ、インキュベータに浸漬し37°Cにて震盪した。sHb溶液のメト化率は、CN⁻の結合を原理とするEvenly-Malloy法により計測した。sHbVのメト化率の測定については、先ずThunburgキュベットにPBS 3 mLを入れ、検体を10 μ L加えてから窒素バブルを行い、キュベット中の酸素を完全に排除し、デオキシ型とメトHbの二成分系とした。可視吸収スペクトルを測定し(V-650 積分球付き, JASCO)、メトHbに起因する405nmの吸光度と、デオキシHbに由来する430nmの吸光度の比から、メト化率を算出した。算出法は、従来法に従った。

上記すべての計測について、比較としてヒトヘモグロビン(_HHb)についても実施した。

C. 結果

1. sHbの精製とsHbVの調製

採血2週間以内のブタ血液からsHbの精製を行なった。比較的新鮮な血液からの精製であるので、溶血度が低く、結果として98%の収率で洗浄赤血球を得た。タンジェンシャルフロー限外濾過膜(1000kDa)によるストロマ除去も支障無く行なえた。一酸化炭素結合sHbの加熱処理(60°C, 15時間)のあと、変性不溶化した夾雑タンパク質を除去し、濁りの無いsHbCO溶液が90%の収率で得られた。更にタンジェンシャルフロー限外濾過膜(8kDa)による脱塩、濃縮によって、42g/dLにまで濃縮した。これにPLPをPLP/sHb比0, 0.5, 1.0, 2.5となるように添加し、リン脂質小胞体に内包した。粒子径は250nm程度に調節され、またHb/Lipid重量比は1.0-1.1であった。

2. sHbの熱的安定性に関する評価

示差走査型熱量分析(DSC)の結果、sHbO₂, deoxy-sHb, sHbCOの変性温度はそれぞれ、71, 81, 83°Cであった(Figure 1)。Deoxy-sHbについては、

70°C付近に小さな熱吸収のピークが見られるが、これは微量のオキシ体が残存していたことに起因すると考えられた。 $s\text{Hb}$ の変性温度は $_{\text{H}}\text{Hb}$ と同等であった(Table 1)。

Table 1. Thermal stability of swine Hb ($s\text{Hb}$) compared with those of human Hb ($_{\text{H}}\text{Hb}$) and $_{\text{B}}\text{Hb}$.

	Denaturation temperature (°C)			Reference
	HbO ₂	HbCO	deoxyHb	
$s\text{Hb}$	71	83	81	This study
$_{\text{H}}\text{Hb}$	64	78	80	Sakai et al. 2002
$_{\text{B}}\text{Hb}$	70	87	83	Sakai et al. 2002

2. $s\text{Hb}$ および $s\text{HbV}$ の酸素親和度の測定

全ての試料について、PLP/ $s\text{Hb}$ 比が増大するにつれて、 P_{50} 値は増大した。PBS中にある Cl^- イオンが酸素親和度に影響する可能性が考えられたので、 Cl^- の無いPBに希釈した場合についても測定を行

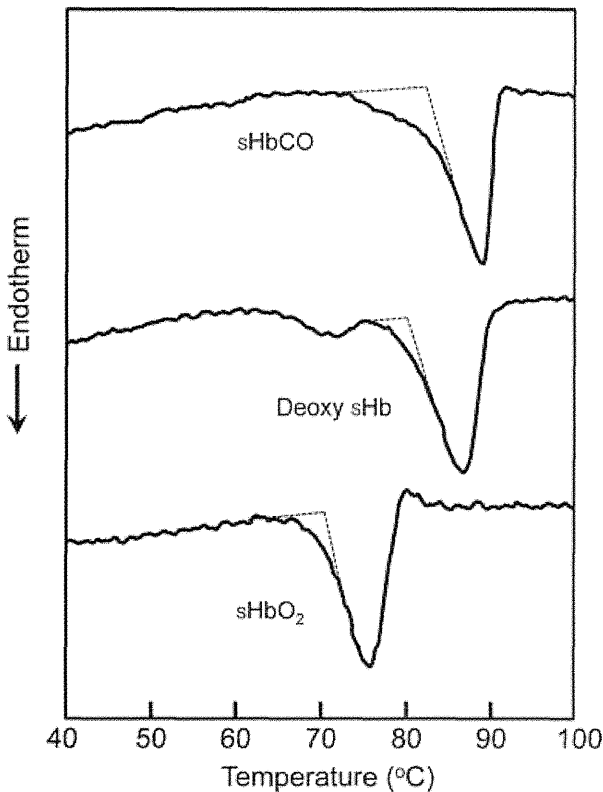


Figure 1. Calorimetric thermograms of $s\text{Hb}$ s in oxy, deoxy, and carbonyl forms. [Hb] = 10 g/dl, 60 μl , scanning rate = 1.0 °C/min.

なった(Fig. 2)。しかし、 Cl^- の影響は殆どみられなかった。従って、 Cl^- は $_{\text{H}}\text{Hb}$ と同様、 $s\text{Hb}$ に対しても影響しないことが解った。PBS, PBの両方において $s\text{Hb}$ と $_{\text{H}}\text{Hb}$ には余り違いは見られなかったが、PLPを添加して小胞体に内包させると、 $s\text{HbV}$ がより大きな P_{50} 値(低い酸素親和度)を示した。 $s\text{Hb}$ のヒル計数は、PLP/ $s\text{Hb}$ 値が増大するにつれ、2.5から2.0に低下した。しかし $s\text{HbV}$ については、PLP/ $s\text{Hb}$ 値が増大するにつれ、1.4から1.9に増大した。

3. $s\text{Hb}$ および $s\text{HbV}$ の自動酸化速度に関する検討

Figure 3に $s\text{HbO}_2$ と $_{\text{H}}\text{HbO}_2$ をPBSに分散させて37°Cにインキュベートしたときの自動酸化によってメト化率が増大する様相を示した。metHb還元系が全く存在していない状況では、metHbは否応無く増大する。両者において特段の相違は認められなかった。

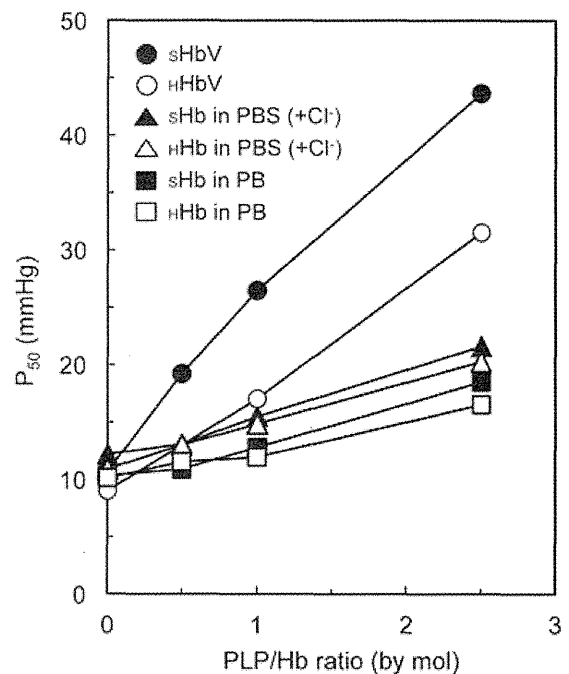


Figure 2. Oxygen affinities (P_{50} values) of $s\text{Hb}$ and $_{\text{H}}\text{Hb}$ samples containing different amounts of pyridoxal 5'-phosphate (PLP), obtained from oxygen equilibrium curves measured using a Hemox analyzer at 37°C. Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and phosphate buffer (PB, pH 7.4) were used for dissolving Hb to confirm the effect of Cl^- anion. HbV is dispersed in hemox buffer.

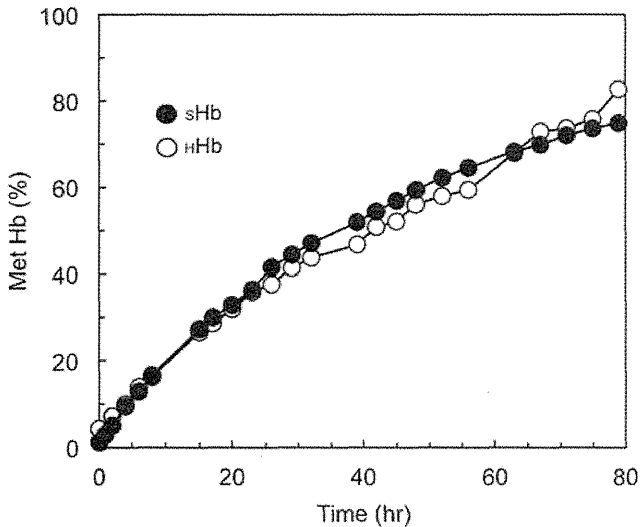


Figure 3. Autoxidation of $s\text{HbO}_2$ in pH 7.4 PBS compared with that of $h\text{HbO}_2$ in aerobic conditions at 37°C.

Figure 4に $s\text{HbV}$ と $h\text{HbV}$ をPBSに分散させて37°Cにインキュベートしたときのメト化率が增大する様相を示した。 $s\text{HbV}$ の方が $h\text{HbV}$ に比較して、あらゆるPLP/Hb比においてメト化が速いことが解った。

D. 考察

今回、初めてブタ由来ヘモグロビンを原料にHb小胞体を調製することを試みた。先ずヘモグロビン精製工程については、ヒト由来赤血球から実施している精製方法がそのまま採用され、一酸化炭素の結合、加熱処理、限外濾過膜処理など全く問題なく処理することができた。新鮮血からの精製が可能なので、収率が高いことが利点となる。また、ヘモグロビンの内包についても特に支障となることは見出されなかった。物性値もヒト由来ヘモグロビンを用いている場合と同等であった。ただ、酸素親和度と自動酸化速度に差異が認められた。

カルボニル型、デオキシ型 $s\text{Hb}$ ともに、オキシ型に比較して変性点が高かった。これは以前に我々が確認したヒト由来ヘモグロビン、ウシ由来ヘモグロビンと同等の結果であった。オキシ型 $s\text{Hb}$ は変性点が60°C付近であるものの、これよりも低い温度でも自動酸化によってFigure 3に示した如くメ

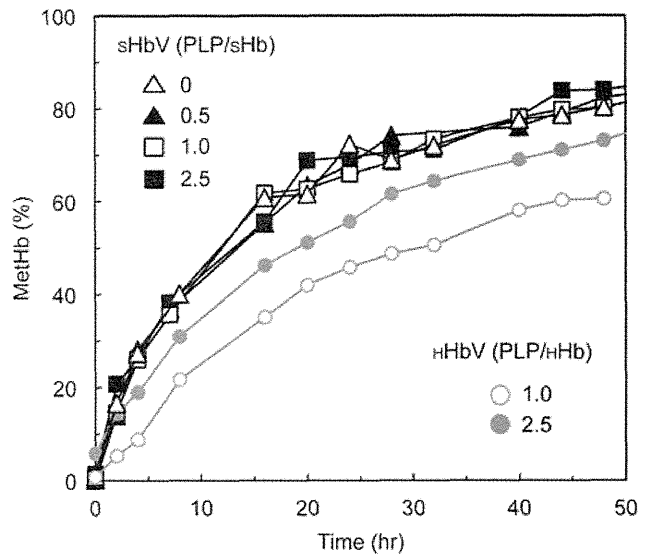


Figure 4. Autoxidation of $s\text{HbV}$ in pH 7.4 PBS in comparison with $h\text{HbV}$ in aerobic conditions at 37°C.

ト化が進行する。事実、metHbは非可逆的にグロビン鎖が次第に変性してしまう。カルボニル型、デオキシ型のみがmetHb生成を抑制することができるのである。ここで示されたカルボニル型 $s\text{Hb}$ の熱的安定性から、 $s\text{Hb}$ は60°Cにおける加熱処理においても変性することなく、機能を保持できることを意味している。

$s\text{Hb}$ の酸素親和度について、PBS(Clあり), PB(Clなし)において差異は認められなかった。この傾向はヒト由来 $\text{Hb}(h\text{Hb})$ と一致するが、ウシ由来 $\text{Hb}(b\text{Hb})$ とは異なっている。文献によれば、 $b\text{Hb}$ はClの影響を強く受ける。哺乳類のヘモグロビンは大きく二つに(低酸素親和度Hbと高酸素親和度Hb)分類される。 $h\text{Hb}$ と $s\text{Hb}$ は高酸素親和度Hbに分類され、 $b\text{Hb}$ は低酸素親和度Hbに分類される。齧歯類、イヌ、ブタ、馬、ラクダ、有袋類、および殆どの霊長類が高酸素親和度Hbであり、ウシ、ヒツジ、ヤギ、鹿、ネコ、霊長類の例外としてキツネザルが低酸素親和度Hbに該当する。高酸素親和度Hbを内包する赤血球では、解糖系で産生されるアロステリック因子2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG)により酸素親和度が適度に調節される。 $s\text{Hb}$ をもとにHb小胞体を調製する際は、2,3-DPGの代わりにPLPを添加している。小胞体に内包させる前は、

PLP添加による酸素親和度の低下は $s\text{Hb}$ と HHb では同等であった。小胞体化した場合、 $s\text{Hb}_V$ は HHb_V と同様に酸素親和度が低下(P_{50} 値が上昇)する。しかし、 $s\text{Hb}_V$ の方が HHb_V に比較して酸素親和度が低い(P_{50} 値が高い)傾向を示した。従って、小胞体内の濃度が極めて高い状況においては、 $s\text{Hb}$ はより強くPLPと結合している可能性が示唆された。

文献によれば、低温において $s\text{Hb}$ は HHb に比較して酸素親和度が低い(P_{50} が大きい)ことが知られており、また $s\text{Hb}$ は温度変化の影響を受け難いことが報告されている。このことは、ブタが元来低温に対して耐性があることと関連があるかもしれない。 $s\text{Hb}_V$ は低体温における利用に有効である可能性がある。

精製 $s\text{HbO}_2$ と HHbO_2 の自動酸化速度は同等であったが、小胞体に内包させると、 $s\text{HbO}_2$ の方が明らかに自動酸化が速くなった。この理由については不明である。両者のグロビン鎖の構造は殆ど同じであるが、相違点としては、(i) β サブユニットのHelix Aのシフト、(ii) β サブユニットのアミノ基末端Helix B、またカルボニル基末端Helix Eのヘリックスが一部コイルを巻いていないこと、(iii) α -ヘリックスを繋げているループの位置が若干異なることなどが挙げられる。これらの僅かな違いが、自動酸化速度の違いに（特に小胞体に内包された濃厚系において）影響している可能性はある。自動酸化を低減する方法、或は自動酸化して生成した metHb を還元する方法については、これまで多くの研究の蓄積があるが、最近、メチレンブルーをつかうことが有効であることが解って来たので、解決できるものと考えている。

E. 結論

ブタヘモグロビンの精製を初めて試みたところ、一酸化炭素化、加熱処理、限外濾過膜処理を経て、ヒトヘモグロビンの場合と同様に、精製濃縮ヘモグロビンを得ることができた。そして、得られたブタヘモグロビンを用いて Hb 小胞体を調製するこ

とができた。酸素親和度や自動酸化速度に若干の違いはあるものの、酸素運搬機能は同等であり、ブタヘモグロビンは人工赤血球の原料になりうることを確認した。

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。

問題点1：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し、再切断を要することや、場合によっては死に至ることがある。（横紋筋は6時間で虚血障害が発生）。

問題点2：同種移植においては、何といても慢性的ドナー不足が問題である。

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、ドナーの死後ま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。

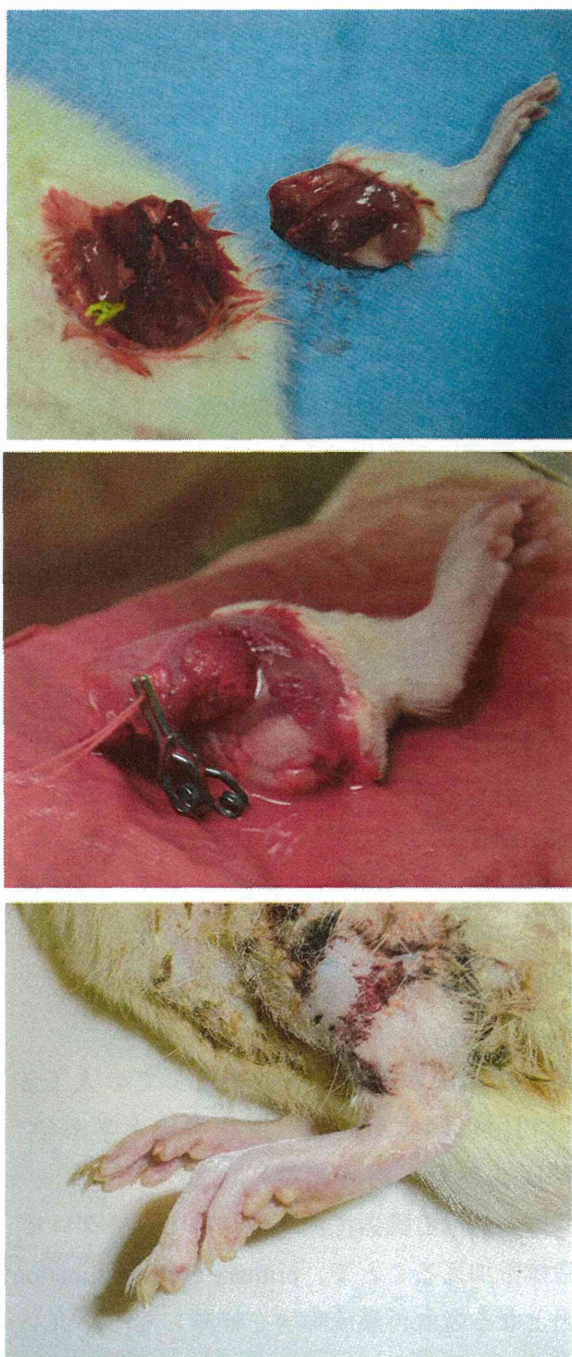


Figure 1. ラット切断下肢の人工赤血球による灌流と再接着試験

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

灌流前に約180mmHgあった保存液中の酸素分圧(pO₂)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。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。

D. 考察

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。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。今後より長時間の保存後、再接合術を行い、生着・機能を観察していく必要がある。

(補足) 摘出肺の灌流・保存液としての人工赤血球の利用に関する実験 (慶應義塾大学医学部・呼吸器外科・河野光智)

肺移植における臓器灌流・保存液にヘモグロビン小胞体を加えることで、primary graft dysfunctionの原因となる虚血再灌流障害を軽減しうるか否かを検討している。ラット肺を摘出し、気管を人工呼吸器に接続し、ヘモグロビン小胞体を混じた臓器保存液Perfadexを肺動脈から数時間灌流するた

めの回路を作製した。灌流後の肺を組織学的に評価すると間質の浮腫はごく軽度であった。また低酸素ストレスで発現する低酸素誘導因子hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α)に対する抗体を使用して免疫染色するとその発現は最低限に抑制されていた。今後、灌流後のラット肺組織でアポトーシス、炎症性サイトカインに関連する蛋白、遺伝子発現も確認していく。

7. 人工赤血球の臨床研究プロトコルに関する検討

A. 緒言

人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体(以下Hb小胞体)を治療抵抗性の悪性胸壁腫瘍に対する放射線治療の効果を増強するために用いる臨床研究について、倫理委員会に申請することを考え、最善の方法について多方面から検討をしてきたので、草案を紹介したい。

B. 研究の背景

現在国民の死亡の第1位は悪性新生物であり、その大半は固形がんである。固形がんに対する現在の治療の主体は手術、放射線、化学療法であり、局所治療に果たす外科治療、放射線照射の意義は大きい。

しかし、腫瘍が進展すると、局所治療が根治的な意義を持たなくなる症例が少なくない。このように進行した症例であっても局所治療が全く意義を持たないというわけではない。胸部外科領域でも、悪性腫瘍による胸壁進展をきたした症例にあつては、腫瘍は疼痛のみでなく、運動制限や呼吸困難をもたらす原因となり、患者のQOLを著しく低下させる。疼痛の制御には通常中等量から大量の麻薬性鎮痛剤が必要で、麻薬性鎮痛剤の影響に

より、社会的に意義のある活動が制限されること
がおおい。麻薬性鎮痛剤の経口投与による緩和医
療に比べ局所治療によって疼痛を軽減、除去す
ることにより患者のQOLの改善のみならず、栄養状
態の改善、意欲の出現などを除くことが可能で、
予後の延長も望める場合がある。局所治療とし
ては切除よりも局所照射が選択される場合が多い。
しかし、上記のような悪性腫瘍の進行症例では、
すでに多くの治療がなされていることが多く、治
療に対して抵抗性であることが問題点である。

このような困難な状況にある症例の場合、治療
期間の短縮と最大の効果を引き出すことが患者の
残された時間を無駄にしないためにも重要である。

われわれは人工酸素運搬体を開発する中で、酸
素治療薬としての役割を追求してきた。人工酸素
運搬体であるHb小胞体は期限切れの献血血液より
ヘモグロビンを高純度、高濃度に精製し、脂質二
重膜で内包したりポソーム製剤で、その直径は250
nmと、赤血球と比べると粒径が小さく、血漿層に
分散し、Plasma flowのみで赤血球が通りにくい毛
細血管にも分布し、虚血領域や低酸素領域に酸素
供給を行うことができる。

われわれは固形腫瘍に対して治療ができないか
を検討し、酸素運搬体を用いて腫瘍を酸素加し、
照射を行う動物モデルを作成し、検討を行ったと
ころ、放射線による抗腫瘍効果を増強することが
でき、すでにJournal of Surgical Research (2009)に報
告した。また、液体である人工酸素運搬体である
アルブミンヘムを用いて別のモデルで検討したと
ころ、同様に酸素運搬体による腫瘍の酸素化が放
射線照射の効果を増強することが明らかとなった
(Cancer Science 2009)。

そこで、われわれはこの事実を臨床に応用すべく、
進行癌症例で胸壁悪性腫瘍によりQOLが損なわれ
るおそれのある患者に対し、肋間動脈より人工酸
素運搬体を注入しつつ照射を行い、照射による抗
腫瘍効果を増強させる医師主導の臨床研究を実施
することの可能性を検討している。

C. 対象となる症例 (案)

悪性腫瘍症例で浸潤、転移により胸壁に進展し、
疼痛、運動制限を呈し、近い将来に胸壁の病巣の
ために呼吸困難や下肢麻痺などの症状が予想され
る患者を対象とする。通常はConventionalな照射に
よる腫瘍制御および疼痛制御がおこなわれるが、
治療期間が長く(3~4週間程度)、得られる効果は
一時的であることが多い(局所制御が十分でない)。
このような現状で進展する胸壁悪性腫瘍に対する
放射線照射による抗腫瘍効果を増強することがで
きれば、患者のQOLを長く保つことができると考
えられる。対象となる症例は次のすべての条件を
満たす症例とする。

- ◇ 進行悪性腫瘍症例
- ◇ 胸壁進展あるいは胸壁転移症例で、治療によ
り疼痛制御や呼吸機能の改善が期待される患
者
- ◇ 既治療に反応が乏しい症例
- ◇ 脳転移を認めない症例
- ◇ PS 0~2の症例
- ◇ 腎機能、肝機能が正常化もしくは正常に近い
と考えられる症例
- ◇ 予後が3カ月以上あると予想される症例
- ◇ 本治療法に同意が得られた症例

D. 方法 (案)

1) 局所麻酔下に大腿動脈よりカテーテルを挿入
し、血管造影や造影CTを行いつつ、胸壁腫瘍に分
布する肋間動脈に留置カテーテルを留置し、固定
する。症例によっては動注ポートを下腹部皮下に
埋め込む。

2) 照射は集光照射を基本とし、IMRTの手技を用
いて病巣選択的に多門照射を行うが、症例に応じ
てConventionalな2門照射も併用する。

3) 照射室において動脈カテーテルをヘパリン生食でフラッシュする。患者は3Lの鼻カヌラより酸素吸入を行う(5分間)。

4) 100%酸素加したHb小胞体生食分散液30ml(～100ml)をシリンジに吸引し、シリンジポンプに装着する。

5) 照射開始2分前から20ml/分のスピードで動注を行う。(投与量が40mlを超える場合は投与終了と同時に照射が終了するペースで投与開始時間を定める。)

6) 集光照射を行い、帰室する。

7) 集光照射が数回にわたる場合は3回まで(個体への投与量が90ml(～300ml))に到達するまで動注放射線治療を行う。

考えられる合併症

- Hb小胞体に対するアレルギー症状
- Hb小胞体動注による胸壁の疼痛、炎症、壊死、脱落。
- Hb小胞体注入あるいは照射による食道炎、縦隔炎の発生
- 気道内出血
- ARDS等の急性肺傷害 等

(研究協力者の人数)

呼吸器外科	3人
放射線治療科	2人
放射線診断科	1人

(実施期間)

均質で機能的なHb小胞体試料が継続的に作成できるようになった段階で本臨床研究を開始する。(実施時期は体制が整えばなるべく早く行いたい。)また、合併症が発生した場合は、本研究を中

止するとともに究明への最大限の努力を行う。

(実施場所)

カテーテル挿入、留置はアンギオ室で行う。照射は放射線治療室で行う。患者の管理は通常の呼吸器外科の病床にて行う。

E. 研究協力者の選定・依頼と協力の詳細(案)

上記の症例に当てはまる患者を臨床研究実施医師のグループで臨床研究のcandidateとなりうるかを検討したのちに、研究協力者となっていたか患者に口頭および文書によって説明し、同意を得るようにする。

1) 選定基準(13.4に詳述する場合は概要を記載)

- 悪性腫瘍の胸壁進展・胸壁転移を認める症例
- Conventionalな化学療法が無効である症例で、対象となる局所の臨床症状が強い症例(疼痛、呼吸困難、運動制限など)
- 脳転移のない症例
- PSが0から2の症例
- 疼痛緩和、代替医療についても理解している症例

2) 依頼方法

臨床症状に対応する方法について説明し、通常行われる緩和治療、対症療法について説明を行う。さらに本治療法が臨床研究であることをよく理解していただく。また、臨床研究の重要性について説明を行う。以上の説明を口頭、および文書によって行い、同意を得る。

3) 協力の詳細(診療記録の利用、検査、検体の種類・量、服薬、アンケートなど)

- 協力の範囲は診療記録による症状、徴候の変動のデータの提供、
- 治療の実施
- 治療前後の画像データの提供

- ・ 治療前後の採血データの提供
- ・ 症状の緩和の評価
- ・ 予後の確認

F. 計画が準拠する倫理ガイドライン（案）

酸素治療薬として人工酸素運搬体が有効であるとした論文は数報あり、独自に2種類の人工酸素運搬体によって齧歯類の担がんモデルを用い抗腫瘍効果の増強を確認している。関連の学会発表2件、文献報告3件が在る。

G. 研究協力者への危険性とそれへの対処方法、協力者の利益、および社会的な危険性と利益の予測（案）

動物投与での安全性は確保されたと考えている。製剤学的には不十分な点もあるかと考えるが、250nmという大きいサイズのリポソーム製剤なので、現在この種類の薬剤を評価、審査する基準はなく、今後新たな基準を作り上げてゆかなければならないカテゴリーに属する薬剤である。

薬剤特有の危険性は限られたものになると予想されるが、生命に危険を及ぼすような状況が出来た時には回復に全力を挙げることはもちろん、社会に向かって事実を公表し、研究を中断することはもちろん、人工酸素運搬体としてのHb小胞体の開発を初めから洗いなおすことが必要となると考える。

H. 個人情報保護の方法（匿名化の方法、発表の際の配慮等、とくに検体等を学外に移動する場合の配慮）（案）

通常診療上の個人情報保護と同様の手続きを用いて個人情報を保護する。また、研究成果を審査、公表する際には診療情報を匿名化し、個人のプライバシーが保たれるようにする。

研究で得られた検体、画像、検査成績等は学外に移動することはないと考える。

I. 研究協力者に理解を求め同意を得る方法（案）

この治療法を行うに当たっては患者の同意を文書で得るようにする。症例が若年者であったり、精神的に脆弱である場合で、判断能力にかける部分がある場合には、ご両親あるいは家人に十分な説明を行い、本人と家族から文書で同意を取ることとする。

1) インフォームド・コンセントを受けられない協力者（未成年等）が必要な場合の理由
本臨床研究では基本的に成人を対象とする予定。未成年者での適応は現在考えていない。

2) 研究実施前提供試料等を使用する場合の同意の有無、内容、提供時期、関連指針への適合性

N/A

3) 他の研究実施機関から試料等の提供を受ける場合のインフォームド・コンセント（説明書および同意書を添付）

N/A

J. 研究資金の調達方法（案）

動注、照射時は研究費でカバーするが、それ以外は保険診療での治療を行う予定。

K. 研究終了後の試料等の扱い（案）

採血した血液は一部凍結保存を行う。

L. 遺伝子解析研究における配慮（案）

1) 遺伝情報の開示に関する考え方模索

本研究では患者検体を用いての遺伝子検索は行わない。

2) 遺伝カウンセリングの体制

N/A

M. 研究計画の詳細（審査対象が臨床研究計画・医療計画・その他で、臨床観察研究、診断法・治療法の臨床研究、フィールド研究等、疫学研究に属するもの）（案）

1) 研究目的

悪性腫瘍の治療抵抗性の一因となっている腫瘍の低酸素環境を変化させることによって放射線感受性を増強させ、抗腫瘍効果を増強する新たな治療法を開発する。

2) 研究デザインのタイプ

（無作為化比較試験(RCT)、非無作為化比較試験、症例対照研究、等）

本研究はHb小胞体の酸素治療薬としての臨床応用における第I、II相試験と考えられます。

安全性確認と効果判定を同時に行うこととなります。

進行癌症例なので、動物試験から得られた情報をもとにヒトでの投与の安全性を確認し、投与量と投与スピードを決定し、安全性と効果を同時に評価する系を作成します。

効果の評価は症例対象を過去の治療から抽出して比較することで行います。

3) 結果（アウトカム）と原因（曝露）に関する指標

3.1 結果（アウトカム）の指標

（研究目的とする結果、結果評価に用いる指標、結果情報入手時のブラインド、等）

○ 安全性： 動注量を100mlまで増加させた場合の有害事象について検討する。

○ 効果： Primary endpointは腫瘍縮小効果
Secondary endpointは生存期間と患者のQOLの改善度
Surrogate markerとしては腫瘍マーカー

腫瘍の縮小効果はRECISTガイドライン（Response Evaluation Criteria in Solid Tumors、

2009 Ver1.1)) に即して評価する。

QOLの改善はVAS（Visual Analogue Scale）、あるいはVNRS（Verbal numerical rating scale）によって評価する。

Survivalは照射を受けてから死亡までの時間
腫瘍マーカーはCEAを基本とし、症例特異的なマーカーがどの程度低下したかを評価する。

3.2 原因（曝露）の指標

（研究目的とする原因、RCT等の介入研究では介入法や割り付け法、等）

本研究ではプラセボ使用は考慮していない。

3.3 結果に影響する可能性のある因子(交絡要因)に対する配慮

（交絡要因情報の種類・収集法、予測される交絡要因の調整法、等）

本研究では安全性を脅かす要因が交絡要因となると考えられる。第1相試験のみであれば交絡要因を考慮する必要はないと考えられるが、第2相試験としてとらえた場合は、照射後の副作用としての放射線肺臓炎が予後に与える影響が挙げられるが、これらの要因が交絡要因となるかについては現在でははっきりせず、症例ごとに検討し、交絡の可能性が高いとわかった段階で、場合によっては新たに第2相試験を組みなおすことが必要である。

3.4 研究対象者

3.4.1 研究対象者となる可能性のある集団の全体対象となる症例は

- ◇ 進行悪性腫瘍症例
- ◇ 胸壁進展あるいは胸壁転移症例で、治療により疼痛制御や呼吸機能の改善が期待される患者
- ◇ 既治療に反応が乏しい症例
- ◇ 脳転移を認めない症例
- ◇ PS 0～2の症例

- ◇ 腎機能、肝機能が正常かもしくは正常に近いと考えられる症例
- ◇ 予後が3カ月以上あると予想される症例

3.4.2 取込（採用）基準（比較群についても記載）

- 腫瘍の胸壁進展に関しては初回治療であること
- 現疾患の治療にはどのような治療が行われていてもよいが、登録時点で、有効な治療法がなく、進行性であることが明らかな症例。

3.4.3 除外基準（比較群についても記載）

- 脳転移例
- 状態が悪く予後3カ月未満と考えられる症例
- xx病院で治療が不可能な症例

3.4.4 サンプル数およびその算出根拠

癌治療に対する第1相（安全性試験）、第2相試験（容量決定試験）なので、多くの症例数はいらないと考えられる。

低用量群（動注30ml+照射） 3人
 中等用量群（動注60ml+照射） 3人
 高用量群（動注100ml+照射） 3人
 でよいと思われる。

3.4.5（介入研究）対象者に対する介入打ち切り基準（副作用、心身状態の悪化・変化等で介入を中断する場合の基準）

アナフィラキシーショック、血液学的検査で正常範囲から大きく変化が起こった場合。

本人の希望が挙げられるが、研究の実施は1回で終了するため、実質的にはアナフィラキシー以外は研究途中で打ち切りというわけにはいかない。

3.4.6（介入研究）コンプライアンスの確認方法

治療（介入）は医師立会のもとに行われるので、治療後の経過観察上のコンプライアンスに関して患者とよく連絡を取って行う。

3.5 追跡・打ち切り

追跡はxx大学病院外科外来を基軸に医師が定期的に行う。

副作用や、本人の希望で研究が中断した場合は打ち切りとし、死亡により研究から外れた場合は非打ち切りとする。

3.5.1 研究期間

20xx年xx月～20xx年xx月まで x年間

3.5.2（介入研究、前向き観察研究）追跡不能例に対する対処

打ち切り症例として処理する

3.6（介入研究）研究の中止

病勢の進行で治療の継続が困難な場合
 本人の希望がある場合

3.6.1 研究の中止基準

重大な副作用（アナフィラキシーショック、死亡など）が明らかとなった場合。

3.6.2 中止基準の確定法

臨床症状において評価、

N.「説明と同意文書」（案）

.....
 -Hb小胞体を用いた治療抵抗性の悪性胸壁腫瘍に対する放射線照射による抗腫瘍効果の増強-

患者PNO

患者氏名 ○○○○

治療年月日 YY/MM/DD

はじめに

肺がんは根治が難しく、再発の多い腫瘍です。初発の肺癌に対する治療法の開発は最優先で進められていますが、再発に対する治療は効果のある治療法が確立しているとは言えません。とくに疼痛や機能異常などの症状がある場合には再発の治療が効果がないと症状を取るだけの姑息的な治療が主体となります。症状を有する再発症例の治療法を開発してゆくことは肺癌の予後を改善するダメでなく、普通の生活をしながら治療を続けるうえでも重要なことです。

本研究の目的

現在の〇〇様の病状は胸壁に腫瘍が再発し周囲に浸潤しているため、疼痛がある状況です。

本研究ではこのような胸壁の有痛性の腫瘍に対して抗腫瘍効果を有する放射線照射を主体として行い、放射線の感受性を増強するために人工酸素運搬体を動脈より注入したうえで照射を行い、腫瘍の縮小を図り、疼痛を治療しようとするものです。

本研究の根拠

肺癌を含め、固形腫瘍は自律性に大きくなるにもかかわらず、腫瘍を栄養する血管系は正常な成長速度でしか増殖しないため、血流が乏しくなり、低酸素環境に置かれています。

低酸素環境に置かれた腫瘍に対しては抗がん剤や放射線照射の効果が減弱することが判明しており、腫瘍の酸素環境を改善することで治療の反応性がよくなると考えられています。

現在までいろいろな方法で腫瘍の低酸素環境を改善しようとする試みが行われてきましたが、長時間にわたって酸素環境を改善することが困難でした。

われわれは、このような腫瘍を治療するに当たり、腫瘍の酸素環境を改善するために人工酸素運

搬体（人工赤血球）を用いる方法を研究してきました。人工赤血球は血漿相に分散して血流中を流れるため、通常の血液が運ぶ以上の酸素を組織へ運搬することができます。動物モデルを用いて検討したところ、腫瘍部分の酸素分圧を倍以上増加させることができることがわかりました。この酸素環境が改善した時間を狙って放射線照射を行うと、腫瘍は小さくなり、生存期間も延長することがわかりました。

人工酸素運搬体の種類を変えても同様の結果を得ることが可能でした。

現在われわれが開発している人工酸素運搬体はヘモグロビン小胞体といって、期限切れの輸血用血液より酸素運搬を行うヘモグロビンというたんぱく質を抽出精製して、リポソームで被覆し、250ナノメートルの粒子にしたものです。動物実験では血液量の50%を入れ替えても安全であるとの結果を得ています。

本研究ではこのヘモグロビン小胞体を腫瘍を支配する動脈より注入して腫瘍の酸素環境を改善し、放射線照射を行うことで胸壁の腫瘍を縮小させ、症状を改善することを目的としています。

本研究に参加できる患者さんの条件は以下のようになります。

対象となる症例は

- ◇ 進行悪性腫瘍症例
- ◇ 胸壁進展あるいは胸壁転移症例で、治療により疼痛制御や呼吸機能の改善が期待される患者
- ◇ 既治療に反応が乏しい症例
- ◇ 脳転移を認めない症例
- ◇ PS 0～2の症例
- ◇ 腎機能、肝機能が正常かもしくは正常に近いと考えられる症例
- ◇ 予後が3カ月以上あると予想される症例

取込（採用）基準

○ 腫瘍の胸壁進展に関しては初回治療であること

○ 現疾患の治療にはどのような治療が行われていてもよいが、登録時点で、有効な治療法がなく、進行性である症例。

除外基準

- 脳転移例
- 状態が悪く予後3カ月未満と考えられる症例
- xx病院で治療が不可能な症例

本試験にご参加いただけても通常に行われる治療を選択することが可能ですし、不参加による不利益は生じません。

本試験にご参加いただける場合は治療が順調に進んでいる以内にかかわらず、途中で本治療法以外の治療法を選択することも可能ですが、その際は主治医に申告してください。

説明年月日 YY/MM/DD

説明責任者 ◎◎◎◎

説明を受けた人 △△△△

患者氏名 ○○○○

患者家族 □□□□

医師主導の臨床研究同意書

わたくしは「Hb小胞体を用いた治療抵抗性の悪性胸壁腫瘍に対する放射線照射による抗腫瘍効果の増強」の臨床研究に関して十分な説明を聞き、研究の参加を承諾いたしましたので、ここに署名いたします。なお、本研究に伴う合併症が起きた時には研究を中止するとともに可能な範囲内で治療が受けられるよう対処していただけることも了承いたします。

承諾年月日 YY/MM/DD

患者ID

患者氏名

患者家族氏名

(続柄)

.....

8.(独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)の事前面談について

A. 緒言

厚労科研補助金 創薬基盤推進研究事業(創薬総合推進研究事業) 課題「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)」を推進している。プログラムオフィサー(PO)および厚労省よりPMDAの薬事戦略相談を積極的に活用することを勧められ、今回の申込に至った。

B. 方法

(実施年月日)

2012年12月7日 11:00—12:00

(PMDA側担当者名(敬称略))

高見廣行、宇山佳明、増田広之、吉田理人、紀平哲也、仲井友子、谷之口貴光、阿部喜穂

(本研究班側出席者)

酒井宏水(早稲田大学)

(質問事項)

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の検査法、安全性試験について

a) 原料ヘモグロビンは、期限切れの非使用赤血球から精製単離している。精製工程にはウィルス不活化工程(加熱処理 60℃, 12hr)、ウィルス除去工程

(ナノフィルトレーション処理)が含まれる。これらの工程の妥当性を示すための基準は何か(対象ウイルス、必要とされるLog reduction factorなど)。

b) 本製剤の滅菌法について。微粒子(250nm)のため、フィルタ濾過滅菌法が採用できない。 β -プロピオラクトン(BPL)を使う薬液滅菌法の妥当性について。

c) 無菌試験法について、日本薬局方記載の「メンブランフィルタ法」は、フィルタ目詰まりのため採用できない。また、人工赤血球製剤が赤色の分散液のため濁度が高く、日本薬局方記載の「直接法」では判定できない。そこで「直接法」に改良を加え、1回目の培地を2回目の培地に植継ぐことで濁度を低減させて、無菌性を判定することにしたい。この考えの妥当性について。

d) 人工赤血球製剤は、4種類の脂質(リン脂質、コレステロール、合成脂質、PEG結合リン脂質)、ヒト由来ヘモグロビン、ピリドキサル-リン酸から構成される分子集合体(ヘモグロビン小胞体)微粒子が生理食塩水に高濃度に分散した液性製剤である。分子集合体として初めて酸素運搬機能を発揮する安全性の高い微粒子となるので、構成成分それぞれについて単独で安全性評価することは難しい(界面活性の高い脂質、コレステロール、本来赤血球内にあるヘモグロビンなど、単独での投与評価は無意味である)。この考え方について御意見をお聞きしたい。

e) Non-GL製剤について、既に多くの安全性試験を実施してきた(齧歯類、犬、ブタ、サル投与試験、ヒト末梢血混合試験など)。従来に無い新しい製剤(人工赤血球製剤)の安全性試験として、先見的に実施すべき項目として他に何が残されているか(POからの指摘)。

C. 相談概要

対面助言を実施するための資料作成にあたり、上記項目について次の助言を受けた。

a) ウィルス安全性評価については、医薬審第329号「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウィルス安全性評価」、医薬発第1047号「血漿分画製剤のウィルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて」に従って実施するように助言を受けた。また、実際の製造工程と同等性が担保された小型スケールでウィルスクリアランス試験が必要であることを受けた。

b) BPLを使う薬液滅菌について、選択した理由と、残存物についての記載が必要となろうとの指摘を受けた。

c) 人工赤血球の無菌試験法について、選択した理由と、実験結果の詳細についての提示が必要になろうとの指摘を受けた。

d) 人工赤血球の構成成分それぞれについて単独で安全性評価することが困難であることについて、“合成脂質:DHSG”については検討の余地があるかもしれない。従来リポソーム製剤において、薬効を示す成分を除いた空のリポソーム単独についての安全性を検討した例があるので、人工赤血球の場合も、ヘモグロビンを省いたリポソームの安全性試験を実施する必要はあるかもしれない、との意見を得た。

e) 必要となる安全性試験項目については、医食審査発0323第1号「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に従って実施するように助言を受けた。記載されている安全項目のうち不要と思われる点については、何故それが不要なのか、或は不可能なのか、理由を明確にするこ

ととの助言を受けた。また、最終的に人工赤血球の適応疾患を何とするか、それによって安全性試験項目が変化する可能性があるとの助言を受けた。(これについては、投与量が最も多いことが予想される輸血代替を目標として考えていく予定。)

その他、つい最近発令された薬食血発1127号第1号「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく公募について」の通知を受けた。今後、ヘモグロビンの原料となる非使用血液が必要な場合には、日本赤十字社に申請する旨、理解した。

D. 健康危険情報

該当なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 38, 153-158 (2012, Aug).
2. A.G. Tsai, M. Intaglietta, H. Sakai, E. Delpy, C.D. la Rochelle, M. Rousselot, F. Zal. Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier. *Current Drug Discovery Technol.* 9, 166-172 (2012, Sept)
3. H. Sakai, Y. Suzuki, K. Sou, M. Kano. Cardiopulmonary hemodynamic responses to the small injection of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 100, 2668-2677 (Oct. 2012)
4. M. Kaga, H. Ohta, Y. Lee, R. Kamii, H. Yamamoto, S. Akiyama, S. Watanabe, T. Matsuda, Y. Kimura, S. Tsuchiya, H. Tei, L. Okamura, H. Sakai, N. Yaegashi. Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusion for 7 days in Pregnant rats and fetuses. *Life Sci.* 91, 420-428 (2012)
5. K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Maruyama, M. Otagiri. Fourteen-days observation and pharmacokinetic evaluation after massive intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in cynomolgus monkeys. *J. Drug Metab. Toxicol.* 3, 1000128 (2012)
6. H. Sakai, K. Ng, B. Li, N. Sugimura. Swine hemoglobin as a potential source of artificial oxygen carriers, hemoglobin-vesicles. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* (in press)

(Reviews)

7. H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics. *Current Drug Discovery Technol.* 9, 188-193 (2012, Sept.)
8. 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* 81 (suppl.), SA002-1 – SA-002-11 (2012)
9. 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.) World Scientific, Singapore (in

press)

10. 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). (in press).

11. T. Ikeda, H. Horinouchi, Y. Izumi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier as a resuscitative fluid for hemorrhagic shock: acute and long-term safety evaluation using beagle dogs (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). (in press).

2. 学会発表

1. T. Sato, O. Glatter, H. Sakai / Hierarchically organized functional particles: static structure and diffusion dynamics of artificial red cells and their implication for medical applications / International Association of Colloids and Interface Scientists Conference / Sendai, Japan / 13-18 May 2012

2. H. Sakai, Y. Suzuki, K. Sou, M. Kano / Cardiopulmonary hemodynamic responses to the injection of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs / 9th World Biomaterials Congress / Chengdu / 2012. June 1-5

3. 服部実、小松晃之、酒井宏水、佐藤高彰 / 高分解能小角X線散乱法による水溶性高分子の溶液中における階層的マイクロ構造 / アジア連携分子研研究会 溶液・ソフトマターの新局面：実験及び理論研究手法の開拓と新規物性探索への展開 / 分子科学研究所 / 2012. 6.1-2.

4. 佐藤高彰、小松晃之、酒井宏水、 / 小角X線散乱法を用いた蛋白質溶液への多面的アプローチ-蛋白質間相互作用から立体構造予測まで- / アジア連携分子研研究会 溶液・ソフトマターの新局面：実験及び理論研究手法の開拓と新規物性探索への展開 / 分子科学研究所 / 2012. 6.1-2.

5. H. Sakai / Artificial Red Cells (Hemoglobin-vesicles) as a Cellular-type Hemoglobin-based Oxygen Carrier for Versatile Clinical Applications / BIT's 1st Annual International Symposium of Hematology / Beijing / 2012. June 15-17

6. H. Sakai / Gas Bioengineering of Artificial Red Cells (Invited) / 28th Annual Conference, on 40th Anniversary of Faculty of Medicine, Prince of Songkla University / Hat Yai, Thailand / 2012, Aug 8.

7. 酒井宏水 / リポソーム製剤としての人工赤血球の効率の高い製造法 / 産学官連携推進会議<第11回>イノベーションジャパン2012 / 東京フォーラム / 2012.9.27-28

8. 酒井宏水 / 人工赤血球/代用血漿剤(水溶性高分子)分散系のレオロジー挙動 / 第60回レオロジー討論会 / 名古屋大学 / 2012.9.27-28.

9. 堀之内宏久、山本尚志、勢司泰久、山本学、泉陽太郎、酒井宏水、小松晃之、小林絃一/固形腫瘍組織の酸素加による治療効果の増強 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

10. 田口和明、酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、丸山徹、小田切優樹 / 細胞型人工酸素運搬体へヘモグロビン小胞体のカニクイザルへの大量投

与の結果からみた実効性 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

機序に関する検討 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

11. J.A. Plock, N. Rafatmehr, E. Tsuchida, H. Sakai, D. Erni / Hemoglobin vesicles and wound healing / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

17. H. Sakai / Recent progress of artificial red cells project / 3rd Anniversary Symposium of Waseda Bioscience Research Institute in Singapore / Biopolis, Singapore / 2012.11.2

12. 藤原満博、東寛、池田久實、酒井宏水、堀之内宏久、高本滋 / 空リポソームの投与によるex vivoでのラット脾臓T細胞の増殖抑制における細胞周期調節タンパクの関与 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

3. 報道など

1. NHK Eテレ「サイエンスZERO」人工赤血球の研究を紹介 (2012年7月15日)

2. J-CASTニュースに紹介記事。「早大グループが「人工赤血球」を開発 大学見本市で発表」(2012年10月19日)

13. 酒井宏水、鈴木勇司、宗慶太郎、狩野真由美 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)をブタに少量投与したときの血行動態に関する検討 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

3. 日本経済新聞 朝刊に紹介記事。「知の明日を築く、アジア発、生命科学研究」(2012年12月6日)

14. 太田英伸、李コウ、加賀麻衣子、田口和明、大柿滋、泉仁美、稲垣真澄、土屋滋、岡村州博、小田切優樹、酒井宏水、八重伸生 / ラット妊娠母体におけるヘモグロビン小胞体の胎盤通過性 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

F. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況願状況 (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. ヘモグロビン小胞体の光還元法 4,181,290

3. メト化防止剤を含有する人工酸素運搬体 4,763,265

15. 勢司泰久、堀之内宏久、酒井宏水、小林絃一 / メチレンブルー及びアスコルビン酸を配合した還元剤によるヘモグロビン小胞体の酸素運搬機能延長の試み / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

4. 配位子置換型輸液製剤 5,020,525

5. US Patent 6,916,303: Photoreduction method for hemoglobin-vesicle

6. US Patent 6,864,094: Method of preserving oxygen infusions.

16. 酒井宏水、林伟莉、李冰 / メチレンブルーによるヘモグロビン小胞体の酸素運搬機能持続の

7. Canadian Patent CA2383977: Method of preserving