

**人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の実用化を目指す研究**

研究代表者 酒井 宏水 奈良県立医科大学医学部 教授

**研究要旨**

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

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

モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与した。健常動物と同様にHb小胞体の大部分は肝臓・脾臓に分布したが、投与後14日目には約5%の放射活性が肝臓において確認されたものの、その他の臓器では消失していた。血漿中に約3%の放射活性が確認されたが、これはHb小胞体の脂質膜が代謝・排泄される過程においてHDL-コレステロールなどに取り込まれた<sup>3</sup>Hが検出されていると推測された。生活習慣病である高脂血症時におけるHb小胞体の安全性(生体蓄積性)を体内動態学的観点より初めて明らかにした。(8)一酸化炭素(CO)を結合させたHb小胞体の特発性肺線維症(IPF)モデルマウスに投与した。肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認され、IPFの新規治療薬としての可能性が見出された。(9)ラットに投与後、摘出した脾細胞では、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。本年度はT細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。産生が増加するものとして、主としてマクロファージが産生する、CC-chemokine, IL-10, TNF- $\alpha$  およびTh1サイトカインであるIFN- $\gamma$ , IL-2が明らかになった。産生誘導が認められないものとしてIL-1 $\beta$ , IL-18, Th2 cytokineであるIL-4, 5, 13が明らかになった。また、リポソームを貪食したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをコントロールマクロファージと比較し、貪食後に発現の増強を認める遺伝子群を同定した。(10)出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。ラット出血性ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミンによる蘇生を行なったところ、著明な左心室伝導遅延と興奮伝播・活動電位持続時間不均一性の増大及び心筋組織のconnexin 43発現異常を惹起し、電氣的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。赤血球治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。このモデルは、Hb小胞体の有効性を評価するのに適したものと考えられ、次年度に継続して検討する予定である。

## 研究分担者

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

岩本美智子 医療法人川村病院 医師  
力久 直昭 千葉労災病院 医師

## 研究協力者

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

## A. 研究目的

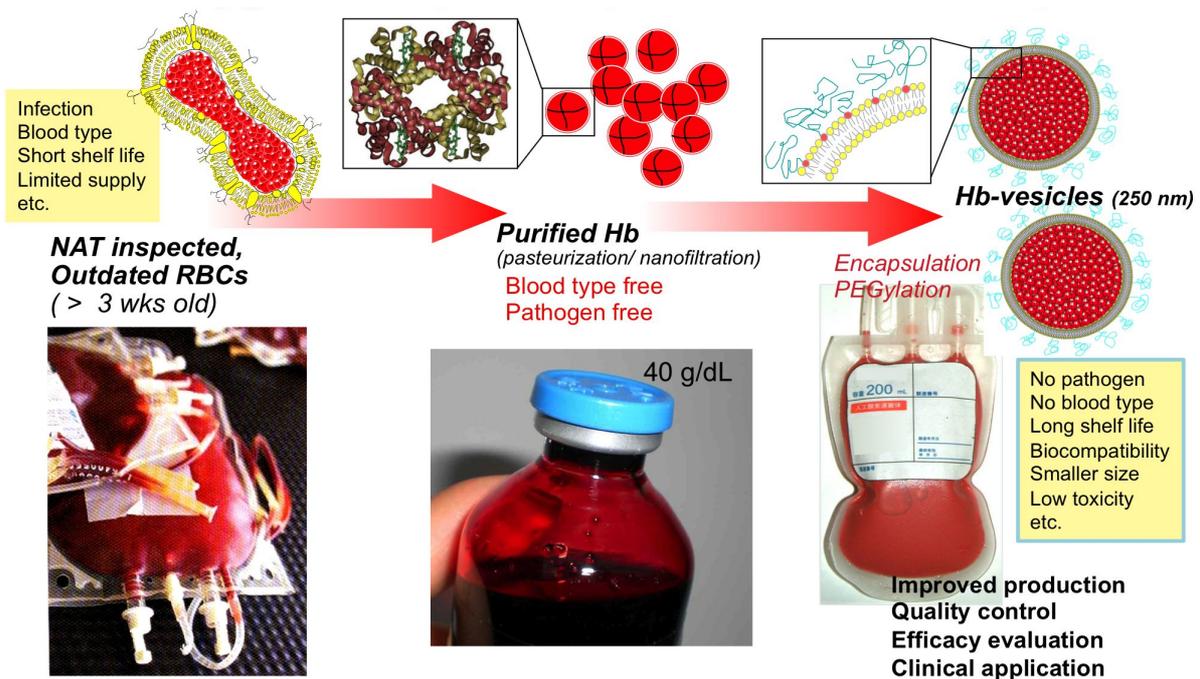
日本の献血-輸血システムの安全性は世界最高水準にあり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、感染の可能性、過誤による血液型不一致、保存期限が3週間と短く災害や有事の危機管理体制に不安を残している。また、少子高齢化により血液の需給バランスが崩れつつある。人工赤血球(Hb小胞体:HbV)は、これらの問題を改善する新しい製剤としてその実現が期待されている。本研究は、期限切れ血液に最も多く含まれるHbの有効利用の観点から政策的に始まった[1]。期

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

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

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

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



小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なうとともに、組織への酸素供給について検討する。(5)毛細管内に分散する人工赤血球を、色素レーザー照射法におけるターゲットとして利用することを目指し、鶏冠を血管腫モデルとして用いる実験を行なう。(6)ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を継続する。(7)高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスにHb小胞体を単回大量投与し、体内動態を検討する。(8)一酸化炭素を結合させたHb小胞体を特発性肺線維症(IPF)モデルマウスに投与し、その効果を検討する。(9)ラットに人工赤血球を投与した後の脾細胞は、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。これに関連し、T細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定する。(10)出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。ラット出血性ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミン、赤血球による蘇生を行い、酸素運搬の必要性を明らかにし、人工赤血球評価法として確立する。以上を目的とする。

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

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

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

## B. 研究方法

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

加する方法を検討した。(4)片肺切除出血マウスモデルを用い、Hb小胞体の投与による蘇生と術後の経過について観察を行なうとともに、組織への酸素供給についてHIF-1の免疫染色を行なった。(5)毛細管内に分散する人工赤血球を、色素レーザー照射法におけるターゲットとして利用することを旨とし、鶏にHb小胞体を投与し、鶏冠を血管腫モデルとして利用し、レーザーを照射し、照射部位について組織病理学的に検討した。(6)ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で灌流する試験を継続した。ラット切断下肢を8時間、Hb小胞体で灌流したあと、再接着し100日間観察をした。(7)高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスに<sup>3</sup>H放射化ラベルしたHb小胞体を単回大量投与し、体内動態を検討した。(8)特発性肺線維症(IPF)モデルマウスを、ブレオマイシン(5 mg/kg)を経気道投与することにより作成した。そして、一酸化炭素を結合させたHb小胞体を投与し、その効果を組織病理学的に検討した。(9)ラットに人工赤血球を投与した後の脾細胞は、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。これに関連し、T細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインをBioPlexにより網羅的に測定した。(10)“出血性ショック心臓”モデルをラット用いて作成し、生理食塩水、5%アルブミン、赤血球による蘇生を行った。そして、心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na<sup>+</sup> channel感受性色素を用いたOptical mapping system (OMP)で興奮伝播・活動電位持続時間不均一性(Action potential duration dispersion: APDd)、致死性催不整脈性を検討した。また、心筋組織のconnexin 43 (Cx43)発現を免疫組織染色にて検討した。

## C. 結果

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

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

結合させたHb小胞体の特発性肺線維症 (IPF)モデルマウスに投与した。肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認された。(9)ラットに投与後、摘出した脾細胞では、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。本年度はT細胞の増殖抑制に伴うサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。産生が増加するものとして、主としてマクロファージが産生する、CC-chemokine, IL-10, TNF- $\alpha$  およびTh1サイトカインであるIFN- $\gamma$ , IL-2が明らかになった。産生誘導が認められないものとしてIL-1 $\beta$ , IL-18, Th2 cytokineであるIL-4, 5, 13が明らかになった。また、リポソームを貪食したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをコントロールマクロファージと比較し、貪食後に発現の増強を認める遺伝子群を同定した。(10)出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈する。ラット出血性ショックモデルを用い、生理食塩水、5%アルブミンによる蘇生を行なったところ、著明な左心室伝導遅延と興奮伝播・活動電位持続時間不均一性の増大及び心筋組織のconnexin 43発現異常を惹起し、電氣的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。赤血球治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。

#### D. 考察

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

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

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

血症時)における詳細な安全性を明らかにしていけると考えられる。これらの検討項目については、次年度に行っていく予定である。(8)一酸化炭素(CO)を結合させたHb小胞体を特発性肺線維症(IPF)モデルマウスに投与した。肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認され、IPFの新規治療薬としての可能性が見出された。Hb小胞体は、COの有用なキャリアとなりうることから、CO-Hb小胞体はIPFの新規治療薬としてだけでなく、炎症や活性酸素が関連する多くの疾患の治療薬候補として有望ではないかと考えられる。来年度以降にCO-Hb小胞体の更なる可能性について追及していこうと考えている。

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

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

## E . 結論

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

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

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

## F . 健康危険情報

なし

## G . 研究発表

各分担研究報告書に詳細を記載。

## H . 知的財産権の出願・登録状況

(発明者, 酒井宏水ほか)

1. 安定保存可能な酸素輸液剤 3,466,516
2. メト化防止剤を含有する人工酸素運搬体 4,763,265
3. 配位子置換型輸液製剤 5,020,525
4. US Patent 6,864,094: Method of preserving oxygen infusions.
5. Canadian Patent CA2383977: Method of preserving oxygen infusions.
6. US Patent 7,417,118: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier
7. European Patent 1,466,649: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier
8. PCT/JP2012/59233 (2012年4月4日出願): 小胞体の製造法. (2013年度に国内段階移行完了: 米国, インド, 中国, EP, 日本)

