

201407018A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

(研究課題番号：H24-創薬総合-一般-009)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 酒井 宏水

(奈良県立医科大学)

平成 27 (2015) 年 5 月



別添 1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

(研究課題番号：H24-創薬総合-一般-009)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 酒井 宏水

(奈良県立医科大学)

平成 27 (2015) 年 5 月

## 目次

I. 総括研究報告書 .....	1
酒井 宏水 (奈良県立医科大学 医学部 化学教室 教授)	
II. 分担研究報告書	
1. 酒井 宏水 (奈良県立医科大学 医学部 化学教室 教授) .....	7
2. 小田切 優樹 (崇城大学 薬学部 教授) .....	23
3. 東 寛 (旭川医科大学 医学部 教授) .....	35
4. 高瀬 凡平 (防衛医科大学校付属病院 集中治療部 准教授 (臨床教育教授)) .....	39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	47
IV. 研究成果の刊行物・別冊 .....	49

## 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ている。平成26年度の成果は以下の通り。(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を継続して検討している。脂質量40g, 高純度高濃度Hb溶液140 mLをもとに、10分程度の混錬操作で約300 mLのHb小胞体を繰返し製造している。次いで一酸化炭素除去、脱酸素化工程を経て、保存できる状態に瓶詰めし、各分担研究者の動物実験に供した。(2) 医療機関から不定期で発生する廃棄血を集めて、まとまった量となつてからHb精製を開始することを考えた場合に、赤血球の保存法が重要となる。Hbのメト化を抑制する凍結保存法を検討し、グリセロールの僅かな添加で十分にメト化を抑制することができた。(3) 片肺切除出血ラットモデルを用い、人工赤血球の投与による蘇生を行なった。動脈血圧と動脈血酸素分圧、血中乳酸値の評価では、呼吸機能が低下した肺切除下のラットにおいてもHbV投与は保存赤血球輸血と同等に機能したと考えられ、手術時の大量出血に対しても、HbV投与が有効である可能性が示唆された。(4) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で8時間灌流する試験において、再接合術を行ったあとラットが歩行できるまで機能が回復していることを確認した。(5) PMDAの事前面談を受け、製造工程や非臨床試験プロトコル作成について助言をえた。実施企業を探索する活動を行なったが、見出すことは出来なかった。企業が開発を躊躇う理由も明確になった。しかし、本製剤の有用性は疑いの無いこもの判断し、次年度は日本医療研究開発機構(AMED)の研究費を得て、開発を継続するための準備を開始した。(6) 高脂血症モデルのApoE欠損マウス(B6. KOR/StmSlc-Apoe<sup>shl</sup>マウス)に静脈内単回投与し、生理食塩水投与群と比較することで安全性を評価した。体重、血球数には変化はなく、AST, ALTは一日後に上昇したがその

後は正常値に復した。血中脂質成分濃度は1,3日後に上昇したが7日後には正常値に戻り、脂質代謝異常時においてもHbVは十分な代謝・排泄性を持っていることが示唆された。(7) HbVあるいはHb分子を内包しない空リポソームをラットに投与後に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。T細胞の増殖抑制に伴ってサイトカイン・ケモカインの産生動態がどのように変化しているかについて、前年度に引き続き検討を行った。TGF- $\beta$ 1の産生動態と自然免疫応答への影響を検討する目的でLPS刺激に対するIL-1 $\beta$ 産生能への影響について検討した結果、リポソーム投与によるTGF- $\beta$ 1の産生増加は観察されなかった。また、LPS刺激によるIL-1 $\beta$ 産生動態も特段の変化のない事が示された。(8) T細胞増殖抑制効果が誘導されるリポソームの最小投与量をさらに検討し、循環血液量の5%v/v相当の投与量では、抑制効果が再現性を持って認められるが、2%v/vでは若干の抑制の傾向が認められるも再現性がなく、1%v/vではほぼ完全に抑制効果が認められない事が明らかとなった。(9) 致死性出血性モデルラットに対し、Hb-V分散液を投与し、蘇生率のほか、心臓電気生理学的変化・致死性不整脈発生予防率を検討するとともに、心臓超音波法により心臓機能を比較検討し、赤血球と同等の効果が認められた。

## 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

## 研究協力者

小林 紘一 慶應義塾大学 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 副院長  
 (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  
 松田 信作 慶應義塾大学医学部 助教  
 神山 育男 慶應義塾大学医学部 助教  
 木下 学 防衛医科大学校 准教授  
 藤原 満博 北海道赤十字血液センター  
 製剤開発課長  
 荒木 淳 東京大学付属病院形成外科 医師  
 岩本美智子 医療法人川村病院 医師  
 松平 崇 奈良県立医科大学 助教

## 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(ヘモグロビン小胞体: 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(図1)。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への対応も期待されている。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。

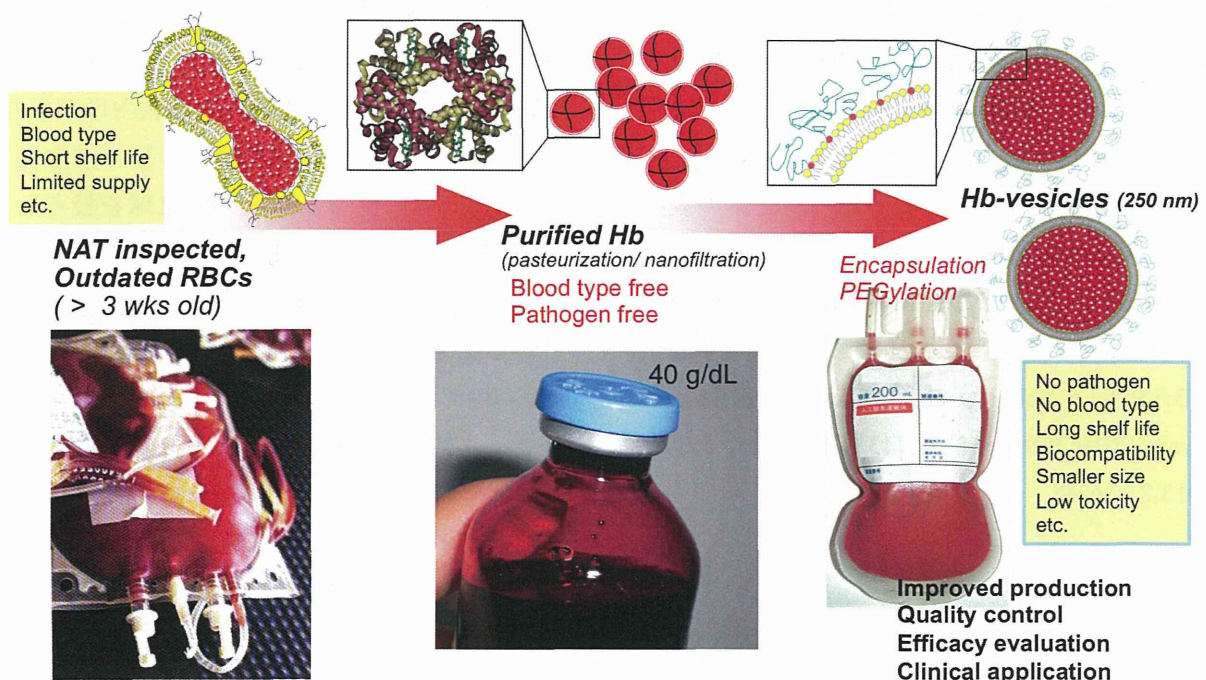
HbVの研究は厚生労働科学研究として推進され、Hb精製、Hbの内包、脂質膜の構成成分の改



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]、肺切除周術期出血モデルなど)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。H25年度までの進捗状況として、先ず製造法について、未解決課題の検討を急ぎ、混錬法によるHb内胞効率の向上[9]と無菌試験法を確立した。輸血代替としての安全性は、先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]。細網内皮系への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。いわゆるAmes試験により、HbVに遺伝子突然変異誘発性は無いことを確認した。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、制御に関与する候補分子の絞り込みを行なっている。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。また、CO結合HbV体が特発性肺線維症の治療に有用である可能性が明

らかになった。がん放射線治療に対する酸素治療薬として使用することについて、臨床研究SOP(草案)を作成した。

本研究では、HbV製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、H26年度は継続して、① ヒト由来Hbを含有する特定生物製剤に分類されること、また、大量投与を前提とするリポソーム製剤の特殊性を考慮し、その製造・臨床試験・臨床研究等の方法について検討する。また、国内外の製剤化・開発企業の探索を進める。② non-GLP試料は定常的に製造しつつ、製剤滅菌法の検討の継続、製造諸工程・分析法についてSOPを作成する。③ 出血性ショック蘇生液など輸血代替として大量に投与することを想定し、免疫系への影響や、体内動態(特に高脂血症モデル)、心筋への影響について検討し、安全基準を見出し非臨床・臨床試験計画に繋げる。他方、本製剤の早急な臨床応用を目指し、④ 臓器灌流保存液としてEx vivo酸素供給灌流液として体外での利用法を引続き検討する。本製剤について多くの経験を有する本研究班と実施企業との密接な連携による、GLP/GMP製剤の非臨床・臨床試験開始への円滑な移行を目指す。



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。また、修飾Hbの臨床試験をリードしていた米国Sangart社のPEG-Hb(Hemospan)は、十分な有効性を見出せず2013年11月に撤退した(高い膠質浸透圧、Hb濃度僅か4.8g/dL、酸素親和度8Torrのため、酸素運搬効果に限界あり)。対してHbVはNOに関連する副作用を脂質膜で遮蔽でき[12]、またHb濃度は10g/dLと高く、第14回国際血液代替物学会(Chengdu, 2013年10月)、第20回日本血液代替物学会年次大会(奈良, 2013年12月)でも注目された。安全性評価試験からも多角的に評価されている[13]。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. [13] 酒井ほか. 人工血液 2013;21:36-48.

## 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、脱酸素化工程もこれまでに確立した方法を採用し、クリーンブース(class 10,000)内にて実施した。(2) 廃棄血をもとに洗浄赤血球を調製し、これに所定量のグリセロールを添加し、-80℃にて凍結保存した。解凍後にメト化率を計測した。(3) 片肺切除出血ラットモデルを用い、人工赤血球の投与による蘇生を行なった。動脈血圧と動脈血酸素分圧、血中乳酸値の評価を行なった。(4) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で8時間灌流する試験において、再接合術を行ったあとラットの歩行状態を観察した。(5) BioJapan, InnovationJapan, MedicalJapan等で展示、NIBIO「創薬ナビ」を活用、血液製剤製造企業数社へ打診した。またPMDAの事前面談を受け、今後の展開について助言を得た。(6) 高脂血症モデルのApoE欠損マウス(B6.KOR/StmSlc-Apoe<sup>sh1</sup>マウス)に静脈内単回投与し、生理食塩水投与群と比較することで安全性を評価した。(7) 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、TGF-β1の産生動態と自然免疫応答への影響を検討する目的でLPS刺激に対するIL-1β産生能への影響について検討した。(8) T細胞増殖抑制効果が誘導されるリポソームの最小投与量の詳細を検討した。(9) 致死性出血性モデルラットに対し、Hb-V分散液を投与し、蘇生率、心臓電気生

理学的変化・致死性不整脈発生予防率、心臓超音波法により心臓機能を比較検討した。

### C. 結果

(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、定常的に試験製造できる状態が整っており、ここで脂質量40g, 高純度高濃度Hb溶液140 mLをもとに、10分弱程度の混錬操作で約300mLのHb小胞体を繰り返し製造している。製造法および分析法についてSOPを作成した。(2) 洗浄赤血球に少量の15vol%以下のグリセロールを添加すれば、メト化率1%以下で長期間冷凍保存することができた。また、グリセロール濃度0.1vol%以下でも、2,3ヶ月であれば凍結保護剤として十分な効果を示す事が解った。(3) 片肺切除出血ラットモデルを用い、人工赤血球の投与による蘇生を行なった。動脈血圧と動脈血酸素分圧、血中乳酸値の評価では、呼吸機能が低下した肺切除下のラットにおいてもHbV投与は保存赤血球輸血と同等の値を示した。(4) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で8時間灌流し、再接合術を行ったあと、歩行が出来るまで機能回復したことを確認した。(5) PMDAの事前面談、医薬基盤研究所の「創薬ナビ」を受け、製造工程や非臨床試験プロトコル作成について助言を得た。実施企業を探索する活動を行なったが、見出すことは出来なかった。企業が開発を躊躇う理由が明確になった。本製剤の有用性は疑いの無いこもの判断し、次年度は日本医療研究開発機構(AMED)の研究費を得て、開発を継続するための準備を開始した。(6) 高脂血症モデルのApoE欠損マウス (B6. KOR/StmSlc-Apoesh1マウス) に静脈内単回投与し、生理食塩水投与群と比較することで安全性を評価したところ、体重、血球数には変化はなく、AST, ALTは一日後に上昇したがその後は正常値に復した。血中脂質成分

濃度は1, 3日後に上昇したが7日後には正常値に戻り、脂質代謝異常時においてもHbVは十分な代謝・排泄性を持っていることが示唆された。(7) HbVをラットに投与した後に摘出した脾細胞で、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察されることに関し、TGF- $\beta$ 1の産生動態と自然免疫応答への影響を検討する目的でLPS刺激に対するIL-1 $\beta$ 産生能への影響について検討した結果、リポソーム投与によるTGF- $\beta$ 1の産生増加は観察されなかった。また、LPS刺激によるIL-1 $\beta$ 産生動態も特段の変化のない事が示された。(8) T細胞増殖抑制効果が誘導されるリポソームの最小投与量をさらに検討し、循環血液量の5%v/v相当の投与量では、抑制効果が再現性を持って認められるが、2%v/vでは若干の抑制の傾向が認められるも再現性がなく、1%v/vではほぼ完全に抑制効果が認められない事が明らかとなった。(9) 致死性出血性モデルラットに対し、Hb-V分散液を投与し、蘇生率のほか、心臓電気生理学的変化・致死性不整脈発生予防率を検討するとともに、心臓超音波法により心臓機能を比較検討し、赤血球と同等の効果が認められた。

### D. 結論

平成26年度の進捗状況として、先ず人工赤血球製剤の製造法の確立については、混錬法によるHb-V製剤の製造を繰り返して行ない、物性値の再現性、並びに混錬条件の最適化を行い、内包効率が一定して60%近くに達する条件を見出し、SOPを作成した。その他、Hb精製に関する新しい知見が得られ、また、物性分析法もSOPを作成し、次年度に向けGMP製造外注先候補企業との協議を開始した。

また、輸血代替としての人工赤血球製剤の安全性の精査については、(i) 投与後のラット脾T細胞の一過性増殖抑制に関連し、Con A刺激によるTGF- $\beta$ 1の産生増強は認めなかった。また自然免



疫系への影響を調べた結果、IL-1 $\beta$ の産生動態には変化を認めなかった。mRNAレベルで発現増強を認めたCD276分子については、蛋白レベルでの明確な増強は確認できていない。(ii) 高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスを用いHb-Vの体内動態、生化学的及び病理組織学的検討を行った結果、一時的な脂質関連の血漿パラメータの変動が起こるものの、Hb-Vは十分な代謝排泄性を有していることが確認された。

有効性の精査については、(i) 致死性出血性モデルラットに対し、Hb-V分散液を投与し、蘇生率のほか、心臓電気生理学的変化・致死性不整脈発生予防率を検討するとともに、心臓超音波法により心臓機能を比較検討し、赤血球と同等の効果が認められた。(ii) ラット肺切除術中出血モデルに対し、リンゲル液や5%アルブミンと比較して、Hb-Vの投与では循環動態がより安定し、動脈血酸素分圧が高い傾向が認められ、乳酸値の上昇を抑制する傾向があった。(iii) ラット切断下肢をHb-Vで灌流・再接着するPOC実験を完了した。予後の機能回復もみられ、臓器保存液としての可能性を確認した(Transplantation印刷中)。

本研究では当初、実施企業に対して技術移転をして早期実用化を目指すことを企図した。しかし、実施企業を見出すべく努力したものの、期間内にこれを見出すことが出来なかった。特定生物製剤であり大量投与を伴う新しい範疇の製剤であること、原料となる廃棄血を一箇所に集めるシステムが無いこと、本製剤の必要性が認識され難く(危機意識の欠如)、市場性が不明瞭であること、以上が企業の開発意欲を削ぐ原因であった。それでも危機管理対策など政策的観点から本製剤の必要性は明らかと考え、次年度日本医療研究開発機構(AMED)助成申請の準備を進めた(2015年2月26日採択通知)。また、PD/POよりHb-Vの適用を限定すべきとの指摘を受け、Hb-V開発の本来の

目的である、輸血代替としての利用に焦点を絞ることにした。AMED研究助成を受けて、製造外注、GLP非臨床試験を経て臨床治験への橋渡しすることを企図するに至った。

#### 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)            |           |

## 分担研究報告書

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

## 分担課題：

1. ヘモグロビン小胞体の製造法に関する検討
2. 赤血球からのヘモグロビン精製に関する検討
3. ラット肺切除術期出血モデルにおいて  
ヘモグロビン小胞体投与が循環動態と酸素化に及ぼす影響
4. ヘモグロビン小胞体による切断下肢の灌流と再接着試験
5. 医薬品医療器械総合機構(PMDA)事前面談

研究代表者	酒井 宏水	奈良県立医科大学医学部化学教室・教授
研究協力者	高折 益彦	川崎医科大学・名誉教授
	小林 紘一	慶應義塾大学・名誉教授
	堀之内宏久	さいたま市立病院・副院長（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呼吸器外科・講師
	松田 信作	慶應義塾大学医学部呼吸器外科・助教
	神山 育男	慶應義塾大学医学部呼吸器外科・助教
	荒木 淳	東京大学医学部附属病院形成外科・医師
	岩本美智子	医療法人社団松弘会 三愛病院・消化器内科部長
	松平 崇	奈良県立医科大学医学部化学教室・助教

研究要旨：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を継続して検討している。脂質量40g, 高純度高濃度Hb溶液140 mLをもとに、10分程度の混錬操作で約300 mLのHb小胞体を繰返し製造している。次いで一酸化炭素除去、脱酸素化工程を経て、保存できる状態に瓶詰めし、各分担研究者の動物実験に供した。2) 医療機関から不定期で発生しうる廃棄血を集めて、まとまった量となつてからHb精製を開始することを考えた場合に、赤血球の保存法が重要となる。Hbのメト化を抑制する凍結保存法を検討し、グリセロールの僅かな添加で十分にメト化を抑制することができた。3) 片肺切除出血ラットモデルを用い、人工赤血球の投与による蘇生を行なった。動脈血圧と動脈血酸素分圧、血中乳酸値の評価では、呼吸機能が低下した肺切除下のラットにおいてもHbV投与は保存赤血球輸血と同等に機能したと考えられ、手術時の大量出血に対しても、HbV投与が有効である可能性が示唆された。4) ラットの切断下肢を人工赤血球分散液で8時間灌流する試験において、再接合術を行ったあとラットが歩行できるまで機能が回復していることを確認した。5) PMDAの事前面談を受け、製造工程や非臨床試験プロトコル作成について助言をえた。実施企業を探索する活動を行なったが、見出すことは出来なかった。企業が開発を躊躇う理由も明確になった。しかし、本製剤の有用性は疑いの無いことの判断し、次年度は日本医療研究開発機構(AMED)の研究費を得て、開発を継続することにした。

## 1. ヘモグロビン小胞体の製造法に関する検討

### A. 緒言

ヘモグロビン小胞体(HbV)は、高純度高濃度ヘモグロビン溶液をリン脂質小胞体(リポソーム)に内包させることによって調製される。リポソームの調製法は様々な方法が知られているが、ヘモグロビンのいわゆるカプセル化工程に相応しい方法は限られていた。それは、赤血球と同等の機能を持たせるには、高濃度(35g/dL超)の粘稠なHb溶液をカプセル化させる必要があり、また、えられるカプセルの濃度も、血液のヘマトクリット(50%近く)にする必要があり、工程がどうしても煩雑になってしまうことが課題であった。そこで我々は「混錬法」による人工赤血球製剤の新しい製造方法を提案してきた。ヘモグロビンの回収率を従来よりも格段と高め、工程を簡略化し、操作時間を短縮できる。今年度は、大型混錬装置を用い、40 gの脂質量から混錬する操作を引続き行い、最適化を試みるとともに、脱CO操作、脱O<sub>2</sub>操作を経て、製剤化する一連の操作が可能であることを確認した。

### B. 研究方法と結果

人工赤血球の製造に関する操作は全てクリーンベンチ内にて行なった。クリーンブース内の清浄度は常にparticle counterでモニタリングし、class 10,000以上であることを確認している。

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-PEG<sub>5000</sub>, 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を用いた。テフロン製のシンキー社製の円柱状容器(内径90mm、内壁を凹凸を加え容器上から見た時にクローバー形になっているもの)に上記混合脂質粉末40gを入れ、高純度ヒトHb溶液(一酸化炭素結合-HbCO体、40-42 g/dL、1.4

dL、pH7.4)を添加した。そして、内蓋をして封入し、混錬装置(自転公転攪拌器、シンキー社製、ARE-500)に低速回転にて3分間混錬処理し、冷却に3分待ったあと、容器内の気相を完全に一酸化炭素ガスで置換して封入した。そして、再度、高速回転にて10分程度の混錬処理を行なった。容器外表面の温度を赤外線温度計にて測定した。次いで、冷却した生理食塩水を添加し、15秒間回転させ、ペーストの粘度を低下させ、分散液とした。溶液を更に生理食塩水で最終的に4倍に希釈したあと、遠心分離(3000rpm、30分、Hitachi社製CF12RX)し、分散しきれていない粒子径の大きい分画の沈殿と、一部変性したHbを沈殿させた。上澄みの相について、孔径0.8μmのフィルタ(DISMIC)を透過させたあと、超遠心分離用の遠心チューブ(230mL容器)に入れ、更に生理食塩水を満たし、50,000gにて30分間超遠心分離(Hitachi社製CP90WX)、得られた沈殿を生理食塩水に再分散させ、Hb濃度を約10 g/dLに調節した。ヘモグロビンの回収率は50-70%となった。粒子径はHORIBA製Nanoparticle analyzerを用いて計測し、中心粒径が220-270 nmであることを確認した。2L茄子型フラスコに入れてロータリーエバポレータにて回転させ、内部に空気を通気しながら、外部から可視光照射し、COガスを光解離させ、酸素が結合したHbに変換した。次いで、酸素を排除し、50mLバイアル瓶に分注した。

### C. 考察

人工赤血球の調製法として、乾燥脂質粉末を濃度高く濃厚Hb溶液に均一に分散させ、且つ粒子径を小さくして調節し、且つHbの回収率を高め、且つ操作中のHbの変性を抑制することのできる、混錬操作の原理を採用する方法を考案し、国際特許出願を完了している(PCT/JP2012/59233)。今年度は合計で35回以上の混錬操作を試み、混錬操作の条件設定の微調整を行なった。一連の製造法、および分析法のSOPを作成した。



## D. 結論

混錬法によるHb小胞体の調製を試みた。結果として、Hb回収率60-70%で粒子径250nm程度のHb小胞体分散液約300 mLを一回の混錬操作でしかも短時間(10分程度)で得ることができた。混錬法に用いる容器は、現在の20倍までのスケールアップが可能である。混錬操作自体は、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。

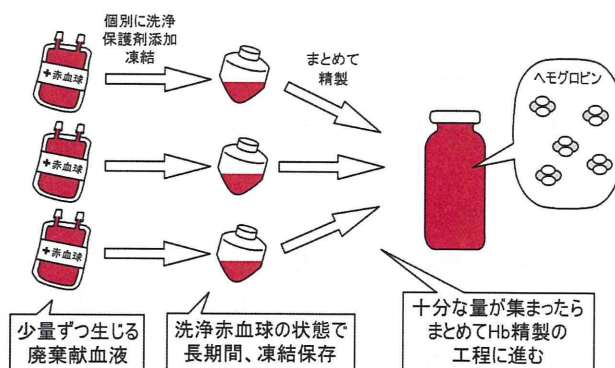


Figure 1. 廃棄血からの赤血球洗浄とHb精製

球の状態 で保存して、十分に量が集まった時点で②以降のHb精製工程を実施することが望ましいと考えた (Figure 1)。

## 2. 赤血球からのヘモグロビン精製に関する検討

### A. 緒言

期限切れ輸血用血液を人工赤血球 (人工酸素運搬体) として再生し、有効に活用するために、赤血球から単離Hbをリン脂質小胞体に封入する方法が検討されている。Hbの精製工程としては、①赤血球の洗浄、②限外濾過膜によるHbの単離、③一酸化炭素による安定化(HbCO)、④加熱(60°C, 10 hr)によるウイルス不活化処理、⑤ナノフィルトレーションによるウイルス除去、⑥脱塩・透析と濃縮、⑦高純度高濃度HbCO溶液としての原料を保存、という一連の製法が確立されている。期限切れ血液の他に、ALT検査で基準値を超えた血液や、不規則抗体を持つ血液も、輸血には不適であるため廃棄される。廃棄される血液を原料として利用する場合、廃棄量が一年を通して一定ではなく、少量の廃棄血液が発生する度に、一連の工程を繰り返すことは非効率的である。このように一度に発生する量が多くない血液については、①の洗浄赤血

培養細胞<sup>1</sup>、微生物<sup>2</sup>、血液<sup>3-7</sup>など、細胞を含む試料を長期間保存する方法の一つとして、凍結保存がよく知られている。赤血球の凍結保存において問題となるのは、溶血(赤血球膜の破壊)ならびにHbの鉄活性中心の酸化反応(メト化反応)である。メト化したHb(メトヘモグロビン, metHb)には酸素運搬能力がなく、変性して不溶化しやすいため<sup>8</sup>、含有率を低く保つ必要がある。メト化などによる血液試料の品質劣化を防ぐために、凍結保護剤<sup>3-6</sup>や凍結融解方法の工夫<sup>5-7</sup>が検討されており、高濃度のグリセリンを使用した凍結保存法により血液試料の年単位の保存が可能であると報告されている<sup>3,4</sup>。Hb精製の一工程として洗浄赤血球の凍結保存を組み込むことを考えた場合、Hbの機能が維持できれば(メト化を抑制できれば)、溶血することには特に支障は無い。凍結保護剤には、水溶性が高く、毒性が低く、Hbと容易に分離できる低分子化合物であるという性質が要求される。また、後に効率よく赤血球からHbを精製するためには、添加剤の量は少ない方が望ましい。本報告書では、赤血球の保存剤として最も多く検討されているグリセリンを試し、Hbをメト化させずに洗浄赤血球を長期凍結保存するために最適な方法を検討した。

## B. 方法

使用した非使用廃棄血については、日本赤十字社により、ALT検査落ち献血液の譲渡を受けた。

### 1) 赤血球の洗浄

70%エタノールで表面を滅菌した血液バッグをクリーンルーム内で開封し、赤血球を500 mL遠沈管に250 mLずつ分注した。赤血球と同量の生理食塩水を加えて均一になるまでゆっくりと転倒攪拌したのち、3,000 rpm、4 °Cで30分遠心分離し、上澄みを吸引除去した。生理食塩水による洗浄操作をさらに2回繰り返し、各遠沈管あたり約150 mLの洗浄赤血球を得た。

### 2) メト化率の測定

凍結された赤血球を容器ごと37 °Cの恒温槽中で加温して融解し、吸光度測定法<sup>9</sup>によるメト化率の測定を行った。metHbのシアノ化に伴う630 nmの吸光度の減少量を、試料溶液と、試料中の全Hbをメト化した溶液とで比較してメト化率を算出した。吸光度測定には、日本分光製JASCO-V650を用いた。

### 3) 凍結保存

洗浄赤血球を約6.5 mLずつ15 mL遠沈管に分注した。Table 1の比率に従って日本薬局方のグリセリン添加剤を加え、それぞれ均一になるまでゆっくりと転倒攪拌し、-80 °Cで凍結保存した。

Table 1

洗浄赤血球への日本薬局方グリセリンの添加比率

Sample Name	RBC/mL	凍結保護剤/mL (ca. 85% glycerol)	saline/mL	total volume /mL	保護剤終濃度 /vol%
30%	6.5	3.545	0	10.0	30
15%	6.5	1.393	0	7.9	15
7.3%(1M)	6.5	0.611	0	7.1	7.3
5%	6.5	0.406	0	6.9	5
3%	6.5	0.238	0	6.7	3
1%	6.5	0.077	0	6.6	1
0.50%	6.5	0.038	0	6.5	0.5
0.10%	6.5	0.0077	0	6.5	0.1
control	6.5	0.000	0	6.5	0
5% dilute	6.5	0.765	5.735	13.0	5
3% dilute	6.5	0.459	6.041	13.0	3
1% dilute	6.5	0.153	6.347	13.0	1
0.5% dilute	6.5	0.076	6.424	13.0	0.5
0.1% dilute	6.5	0.015	6.485	13.0	0.1

\*日本薬局方グリセリン 84~87% glycerol)は、濃度85vol%として濃度計算に使用した。

### 4) 大容量での凍結保存

日本薬局方グリセリン (84~87% glycerol) をオートクレーブで滅菌処理した (121 °C、20分)。受領した献血液をクリーンルーム内で(A)~(D)の方法により洗浄した。

(A) 3回生理食塩水で洗浄した後、84~87%グリセリンを加える。

(B) 2回生理食塩水で洗浄した後、3回目は30vol%グリセリン/生食溶液で洗浄する。

(C) 1回目は30vol%グリセリン/生食溶液で洗浄し、2, 3回目は15vol%グリセリン/生食溶液で洗浄する。

(D) 3回生理食塩水で洗浄した後、洗浄赤血球と等量の30vol%グリセリン/生食溶液を加える。

(A)~(D)の洗浄赤血球を、500 mL遠沈管ごと-80 °Cで凍結保存した。保存49日後に37 °C恒温槽中で融解し、クリーンルーム中で開封、一部をエッペンドルフチューブにサンプリングしてメト化率を測定した。エッペンドルフチューブは-30 °Cの冷凍庫、500 mL遠沈管は再び-80 °Cで凍結保存した。冷凍庫に保管したエッペンドルフチューブ中の洗浄赤血球を、保存35日後に37 °C恒温槽中で融解し、メト化率を測定した。

## C. 結果

グリセリンを凍結血液の保護剤として使用した報告例は多い<sup>3-5</sup>。高濃度 (40w/v%) のグリセリンを添加して10年以上凍結保存した赤血球の例では、メト化率が0.74±0.26%に抑えられたことが報告されている<sup>3</sup>。

組成を変えてグリセリンを添加し、-80 °Cで28日間凍結保存した洗浄赤血球中に含有されるHbのメト化率を、保護剤を加えなかった場合 (control) と並べてFigure 2(A)に示す。グリセリンは終濃度が7vol%(1 M)~30vol%になるよう調製した。Glcはグルコースの添加を、Liq.N2は凍結時に液体窒素を使用したことを、(dil.)は生理食塩水により液量を

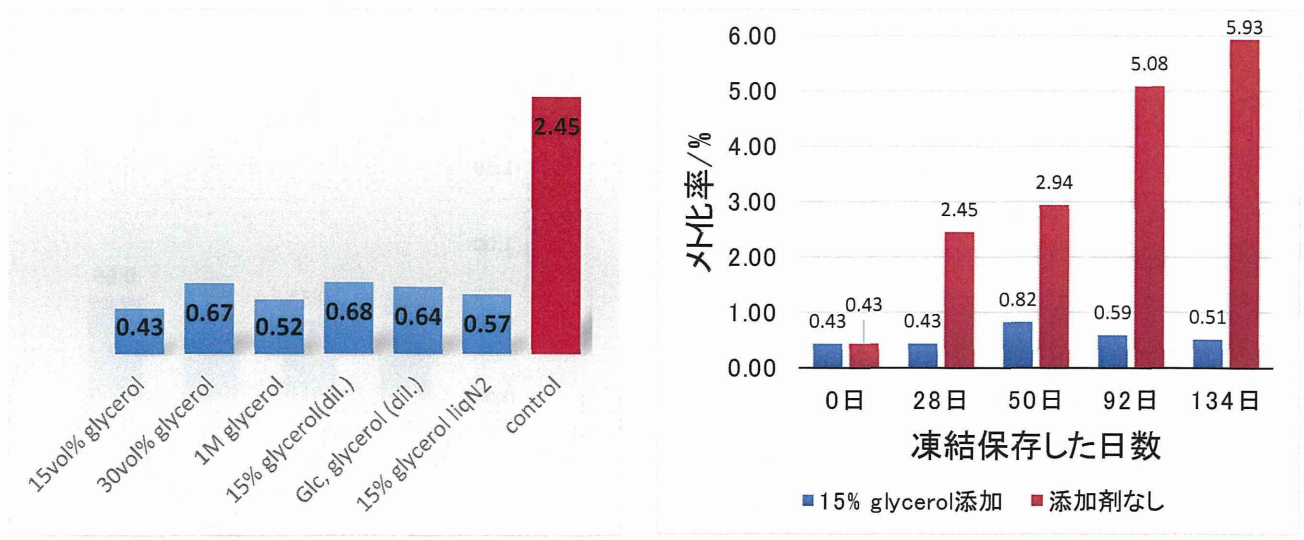


Fig. 2 -80 °C で凍結保存後の洗浄赤血球中に含有される Hb のメト化率。A) グリセリン添加と無添加の試料について、凍結保存 28 日後のメト化率を比較した。B) 15% glycerol 添加について、control とともにメト化率の追跡を継続した。

2倍に希釈していることを表している。凍結保存28日後のメト化率は、controlが2.45%であったのに対し、グリセリンを含有する溶液中では0.43~0.68% (ave. 0.59%) と、いずれも1%以下に抑えられており、グリセリンの添加は効果的にHbのメト化を抑制することが明らかになった。グリセリンを終濃度15vol%になるように加えた洗浄赤血球 (15% glycerol) については、controlとともに継続してメト化率を追跡した (Figure 2(B))。赤色の棒グラフがcontrol、青色の棒グラフが15% glycerolを表して

いる。Controlのメト化率は日数の経過に従って増大しているのに対し、15% glycerolは、134日経過後もメト化率0.51と、凍結前とほぼ同等の値を示した。この結果から、終濃度15vol%になるようにグリセリンを添加することで、洗浄赤血球を少なくとも4ヶ月間は保存可能であることが分かった。グリセリンには細胞内外で氷晶を形成にくくする働きがある<sup>2</sup>。添加されたグリセリンは、水の結晶化による赤血球膜やHbの破壊を阻害することで、メト化を抑制していると考えられる。

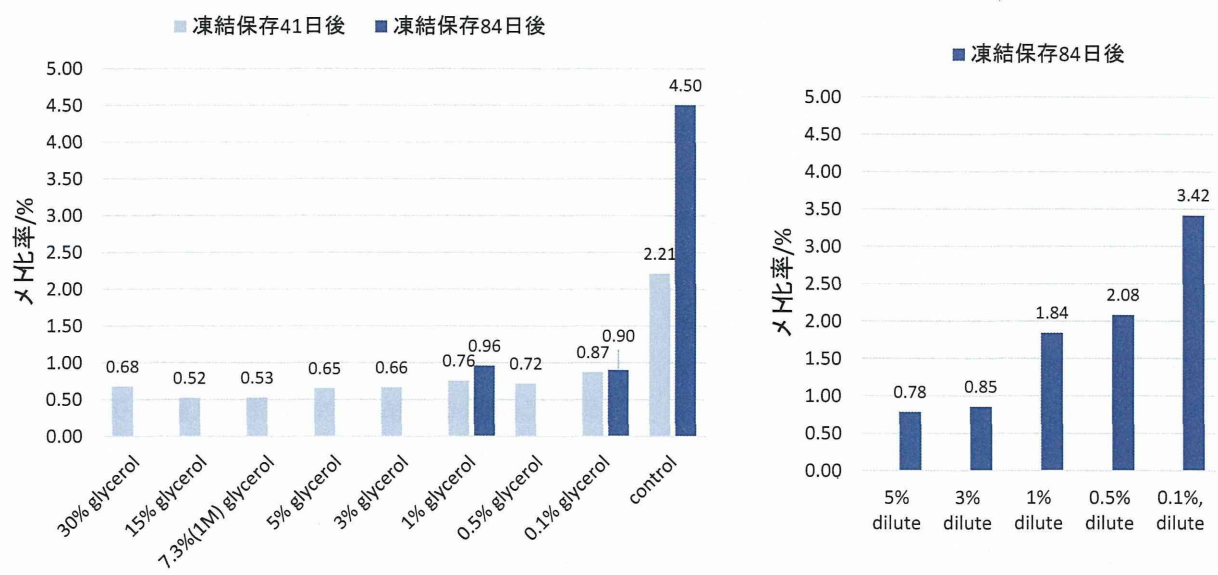


Fig. 3 凍結保存後の赤血球試料に含有される Hb のメト化率。(左) 日本薬局方 84~87%グリセリンを添加して、グリセリンを任意の濃度に調製した。(右) 日本薬局方 84~87%グリセリンと生理食塩水を添加して、グリセリンを任意の濃度に、Hb 濃度を洗浄赤血球の 2 倍に調製した。



### <グリセリン濃度の検討>

次にグリセリンについて、最適な濃度を調べるため、グリセリンの終濃度を0.1~30vol%の範囲で変化させて洗浄赤血球に添加し、メト化反応の抑制効果を調べた。洗浄赤血球に日本薬局方84~87%グリセリンを添加した試料の-80℃凍結保存後のメト化率をFigure 3(A)に示す。凍結後41日後の結果を比較すると、グリセリンを加えた赤血球試料はすべてメト化率1%未満に抑えられており、わずか0.1vol%のグリセリンの添加でメト化抑制効果があることが明らかになった。1vol%と0.1vol%濃度でグリセリンを添加した赤血球試料については、無添加(control)とともに凍結後84日後にも追跡を行った(Figure 3(A))。グリセリンを加えた赤血球試料はいずれもメト化率1%未満に抑制されており、controlとの差がより明確になった。

グリセリンの他に生理食塩水を加えてHb濃度を低下させ、-80℃で84日間凍結保存した赤血球試料のメト化率をFigure 3(B)に示す。生理食塩水でHbを2倍希釈した場合には、グリセリンの終濃度を3vol%以上に保てばメト化率は1%未満に抑制できるが、グリセリン濃度が1vol%、0.5vol%、0.1vol%と低下するに従ってメト化率は上昇し、メト化を抑制する能力が減少していくことが分かった。凍結保存84日後において、同じ終濃度(0.1%, 1%)になるようにグリセリンを添加した赤血球試料を、生理食塩水を加えなかった場合(Fig. 3(A))と、生理食塩水を加えて希釈した場合(Fig. 3(B))とで比較すると、希釈したときの方がメト化率は増大している。より少ない量の添加剤でメト化反応を抑制するためには、ヘモグロビン濃度を低下させないことが重要であることが分かった。

### <大容量での保存>

実際に大量の洗浄赤血球を凍結保存することを想定し、クリーンルーム内で一度に精製できる最も大容量の器具(500 mL遠沈管)を用いて、各250 mL

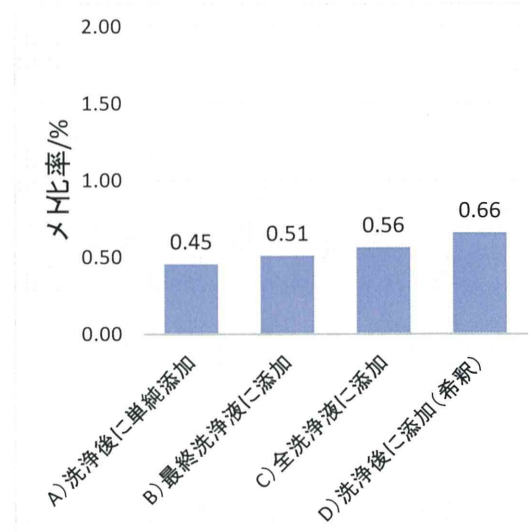
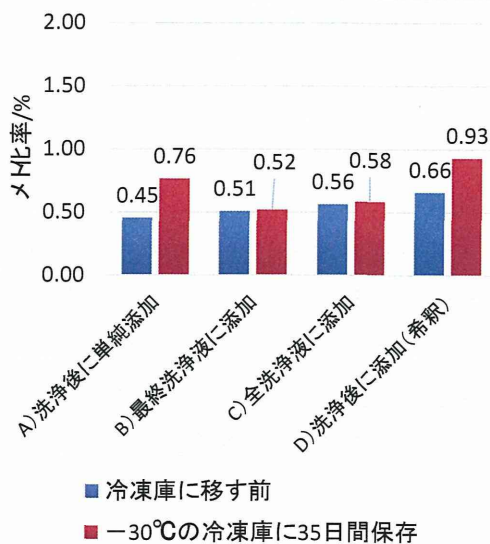


Fig. 4 赤血球の洗浄方法の検討。

の濃厚赤血球を以下に示す4通りの方法で洗浄し、それぞれ-80℃で凍結保存した。

- (A) 常法通り3回生理食塩水で洗浄した後、84~87%グリセリンを加えてグリセリンの終濃度を15vol%に調製する
- (B) 常法通り2回生理食塩水で洗浄した後、3回目は洗浄赤血球と同量の30vol%グリセリン/生食溶液で洗浄して、終濃度を15vol%に調製する
- (C) 1回目は30vol%グリセリン/生食溶液で洗浄し、2, 3回目は15vol%グリセリン/生食溶液で洗浄する。
- (D) 常法通り3回生理食塩水で洗浄した後、洗浄赤血球と等量の30vol%グリセリン/生食溶液を加えて、グリセリンの終濃度を15vol%に調製する。

(B)と(C)では、グリセリンを含む溶液で洗浄するため、生理食塩水により洗浄する常法との違いが生じた。(B)では、グリセリンを含む3回目の洗浄液を加えた後、遠心分離すると、底にグリセリンに類似した粘性の高い液体(固まり)の層が、少量生じた。上澄みの除去には問題は生じなかった。(C)では、1回目の洗浄では30分間、3,000 rpmで遠心分離しても明確な分離面が見えなかった。そこで、さらに30分遠心分離を続けたところ、上澄みが濃く着色した状態で分離面が見えたので上



層を除去した。2回目、3回目の洗浄では30分の遠心分離で分離した。グリセリンの添加により洗浄液の比重が大きくなり、分離しにくくなったと考えられる。

500 mL遠沈管中で49日間、-80°C凍結保存した赤血球試料(A)~(D)のメト化率をFigure 4に示す。メト化率はいずれも1%未満に抑制されていることが確認された。

#### < 冷凍庫での保存 >

大量の赤血球を簡便な方法により保存する工程を考えた場合、-80°Cディープフリーザーではなく、-30°Cの薬用保冷庫、あるいは-20°Cの業務用冷凍庫での凍結保存が望ましい。しかし、赤血球試料を-20°Cで凍結保存した場合、-80°C保存に比べてメト化反応が著しく進行しやすくなることが報告されている<sup>5</sup>。-20°Cでの凍結保存においてもいくつかの保護剤が検討されており、終濃度1 Mのグリセリン添加により、7日間、-20°C凍結保存後のメト化率がほぼ0%に抑えられることが報告されている<sup>5</sup>。

そこで、上述の方法により調製した(A)~(D)の赤血球試料が-30°Cで保存可能か検討した。Figure 4

の測定の後、500 mL遠沈管からエッペンドルフチューブに約300~500  $\mu$ Lほどずつ取り分けられた試料を、Panasonic製薬用保冷庫MPR-215Fの冷凍室に保管した。アルコール温度計で冷凍室の温度を測定したところ、-30°Cであった。-30°Cで35日間保存した後に、融解してメト化率を測定した結果をFigure 5に示す。-30°C保存によりわずかにメト化率は上昇したが、いずれも1%以下の水準を保っており、-30°Cでの凍結保存においてもグリセリンの添加はメト化反応の抑制に有効であることが示唆される。(B), (C)に比べて(A), (D)のメト化率の増大量は大きい。(A), (D)では洗浄を終えてから添加剤を加えるため、Hb濃度が減少している。「Hb濃度が減少すると添加剤のメト化抑制効果が低下する」というFig. 3の結果と同じ傾向を示しており、添加剤の効果を最大限に得るためには、洗浄液に添加剤を混入する方法が有効であると考えられる。ただし、保存35日間の段階では差が小さく、明確に結論づけるには、より長期の保存結果を検証する必要がある。

#### D. 結論

洗浄赤血球の凍結保存におけるメト化反応の抑制方法を検討した。洗浄赤血球に対してグリセリンを終濃度15vol%で添加し、-80°Cで凍結保存することによって、4ヶ月以上が経過しても、メト化率を洗浄直後の新鮮な赤血球と同じ水準に保つことができる。また、グリセリンは添加量が0.1vol%という低い濃度であっても2, 3ヶ月という短い期間であれば凍結保護剤として十分な効果を示すという結果が得られたが、生理食塩水により赤血球を希釈すると、保護効果が薄れることも分かった。一方、-30°C凍結保存においてもグリセリンの添加がメト化反応を抑制することが確認されたが、この温度域において最適な添加剤の濃度は、まだ確定していない。現時点で最も簡便かつ有効と考えられる、献血液の洗浄・保存方法は、献血液(濃赤)を生理食塩水で2回洗浄したのち、0.2vol%濃

度以上のグリセリンを溶かした生理食塩水で1回洗淨して、上澄みを可能な限り取り除き、- 80 °Cで凍結保存する方法と考えられた。

#### (文献)

1. F. Mori, Microbiol. Cult. Coll., 23(2), 89-93 (2007).
2. T. Sato and N. Yanai, 生活環境科学研究所研究報告, 45, 11-16 (2013).
3. J. Lecak, K. Scott, C. Young, J. Hannon and J. P. Acker, Transfusion, 44, 1306-1313 (2004).
4. M. Horie, C. Horiki, J. Iida, S. Otani, M. Okada, K. Hirai and Y. Okubo, Japanese Journal of Transfusion Medicine, 37(5), 651-655 (1991).
5. A. Chanutin and R. R. Curnish, Archives of Biochemistry and Biophysics, 113, 114-121 (1966).
6. M. Yokohama, K. Tanaka and K. Mogi, Jpn. J. Zootech. Sci., 52 (7) 487-492 (1981).
7. T. Nei and N. Hanafusa, Low Temperature Science, Ser. B, Biological Science, 22, 101-107 (1964).
8. 水上茂樹, 赤血球の生化学 [第二版], pp. 156 (1977), 東京大学出版会.
9. 松原高賢, 蛋白質 核酸 酵素, 32, 672-673 (1987).

### 3. ラット肺切除周術期出血モデルにおいてヘモグロビン小胞体投与が循環動態と酸素化に及ぼす影響

#### A. 緒言

人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体(HbV)はヘモグロビンを内包させたりポソームで、期限切れ輸血用ヒト赤血球よりヘモグロビンを抽出、精製、ウィルス不活化を行ったのち、リポソームに内包、膜表面をPEG修飾して粒径を250nm、P<sub>50</sub>は20-25 Torrに調製した粒子である。血液型がなく、ウィルスなどの感染源を排除、室温で2年以上の備蓄が可能である。血液中で酸素運搬体として機能することは、ラットやビーグルにおける交換輸血試験で確認され、90%の脱血交換試験でもラットは生存が可能であった。出血性ショックの蘇生に用いた場合も良好な成績が得られている。手術中の大量出血に対する投与により、赤血球輸血の回避が可能となると期待されている。これまでに肺切除術中に大量出血する動物モデルとして、マウスに30%交換輸血を行い、同時に左肺全摘術を行うモデルを作成し、術後生存率や体重や自発運動量の回復が、HbV投与と輸血とで同等であることを確認している。平成26年度は、ラットを用いて肺切除術を行い、同時に脱血する周術期出血モデルを作成した。ラットでは急速に出血させ、血圧が低下してショック状態となった後も回復が可能であり、マウスよりもヒトの手術時の大量出血に近いモデルである。また連続的な血圧モニターができ、採血を繰り返すことも可能である。このモデルにおいてHbV投与が循環動態と血液の酸素化に及ぼす影響を評価し、周術期大量出血に対するHbV投与の有効性と安全性を評価することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### ラット肺切除モデル

動物：Wisterラット 雄性 8週齢 体重250～300g



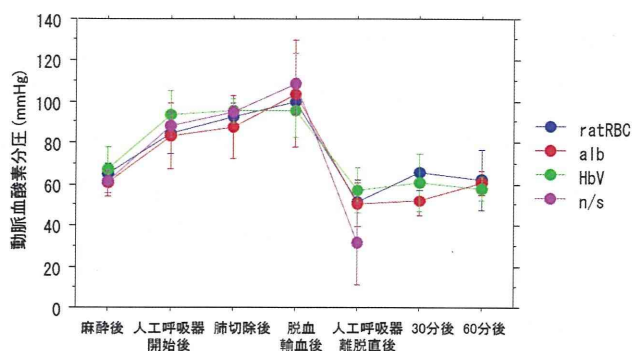


図 1

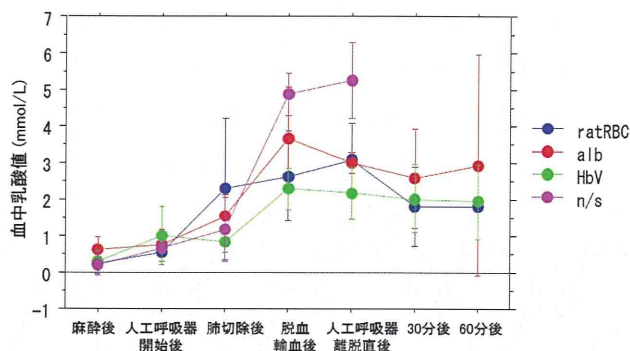


図 2

麻酔：ケタミン 90mg/kg body weight、キシラジン 9mg/kg body weight を筋注する。

カニューレシオン：仰臥位で右総頸動脈及び左内頸静脈からポリエチレンチューブ (PE 31) を挿入、固定し、動脈圧連続測定を開始する。

人工呼吸器：16Gサーフロー針で経口挿管し、一回換気量TV 10ml/kg body weight, 呼吸回数RR 80/min, 呼気終末陽圧PEEP 2cmH<sub>2</sub>O, 酸素分圧FiO<sub>2</sub> 0.21 麻酔ガスセボフルレン0.5-1.0%で維持する。

左肺全摘除：右側臥位でラットを固定する。第5肋間開胸し、肺靭帯を切断し、肺門を3-0絹糸で一括結紮した後、左肺を切除する。

脱血及び輸血：頸動脈カニューレより、急速に全循環血液量の30%を脱血する。脱血量と等量のHbV分散液或いは他の輸液、輸血をする。その間、動脈圧の連続モニタリングを継続し記録する。

閉胸及び人工呼吸器離脱；縫合糸で肋間を閉鎖後、筋層と皮膚を一層で縫合して閉胸する。保温パッドを使用して体温の低下を防ぐ。人工呼吸器を止め、自発呼吸を確認後、人工呼吸器から離脱する。

## 実験群

輸液、輸血を変え以下の動物群を作成する。(n=5~7)

(1) 生理食塩水 (n/s) 群

(2) アルブミン (alb) 群: ヒト血清アルブミンを生理食塩水に溶解し濃度を5%とした溶液

(3) ヘモグロビン小胞体液(HbV群)：HbVを5%アルブミン液に分散した液体。Hb濃度は8.6 g/dlに調整する。

(4) ラット保存赤血球群(ratRBC群)：ラット赤血球を生理食塩水で洗浄後、5%アルブミン液に分散させた液体。Hb濃度は8.6 g/dlに調整する。48時間冷蔵保存後に使用する。

測定項目：術前から人工呼吸器離脱後1時間まで血圧のモニタリングと動脈血液ガス分析と血中乳酸値の測定を行う。

## C. 実験結果

肺切除術後、循環血液量の30%の脱血により血圧は30mmHgまでに低下するが、各輸液、輸血により上昇する。人工呼吸器を停止すると、生理食塩水投与群では血圧が急速に低下し、離脱が困難で全例が死亡した。アルブミン投与群では60%の生存率であった。HbV群とラット赤血球輸血群は循環動態が安定し維持され、全例が生存した。動脈血酸素分圧はHbV群では人工呼吸器離脱後もラット保存赤血球輸血群と同等で(図1)、血中乳酸値も低値が維持された(図2)。

## D. 考察

動脈血圧と動脈血酸素分圧、血中乳酸値の評価では、呼吸機能が低下した肺切除下のラットにおいてもHbV投与は保存赤血球輸血と同等に機能したと考えられ、手術時の大量出血に対しても、HbV投与が有効である可能性が示唆された。今後、実験を継続しHbV投与が循環動態と酸素化に及ぼす影響を詳細に解析する予定である。

## 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

外傷などにより体の一部が切断されてしまった場合、可及的速やかに専門医による再接合術を受けることができれば、その術後の機能は良好に回復する。しかし、切断端の虚血時間が長くなった場合は、その生着や術後機能が著しく損なわれるばかりか、手術後の再灌流障害が重篤となり、急性腎不全から死に至る例もあり、問題となっている。これまで切断肢の保存は湿潤冷却が原則である。今回我々は、人工赤血球ヘモグロビン小胞体(HbV)を用いて、酸素運搬能をもつ臓器組織保存液の開発を行った。

### B. 実験方法

Wistarラットを全身麻酔下に、左後肢を大腿骨幹部レベルで完全切断した。大腿動脈および静脈にカニューレーションを行い、臓器保存液ET-KyotoとHbVを等量混合して作成した灌流液(HbV群)およびET-Kyoto単体(ETK群)にて常温灌流した。1時間ごとに静脈還流液を採取し、血液ガス分析により $PO_2$ 、 $PCO_2$ および乳酸値の測定を行った。6時間常温灌流後、大腿動脈および静脈、大腿神経および坐骨神経を顕微鏡下で吻合し、切断肢再接合術を行った。肢の生着および機能を、腓腹筋の組織学的検査および歩行検査にて評価した。また、従来の保存法である湿潤冷却で6時間保存した群と比較した。

### C. 実験結果

静脈灌流液の血液ガス分析は、ETK群に比べてHbV群は、 $PO_2$ は低く、 $PCO_2$ は高く、乳酸値は低い傾向があり、これはHbVによって組織が酸素供給を受けて好気代謝が保たれていたことを示唆した。6時間保存後の組織学的検査では、湿潤冷却群に比べ、HbV群では軽度、ETK群では重度の間質性浮

腫を生じた。再接合術は全例行えたが、湿潤冷却群は術後3日以内に四肢が壊死し、ETK群は血流が保たれていたものの3日以内に死亡し、HbV群のみが長期生着に成功し、3か月後の歩行検査でも良好な機能回復が認められた(Figure 1)。

### D. 結論

酸素運搬能をもつ人工赤血球を用いた四肢灌流保存法は、従来の組織保存液を用いた灌流保存や湿潤冷却法に比べて有効であることが示された。本法は自家移植のみならず、心臓・肺・肝・腎・膵臓・小腸・子宮などの同種移植にも幅広く用いることができる可能性がある。

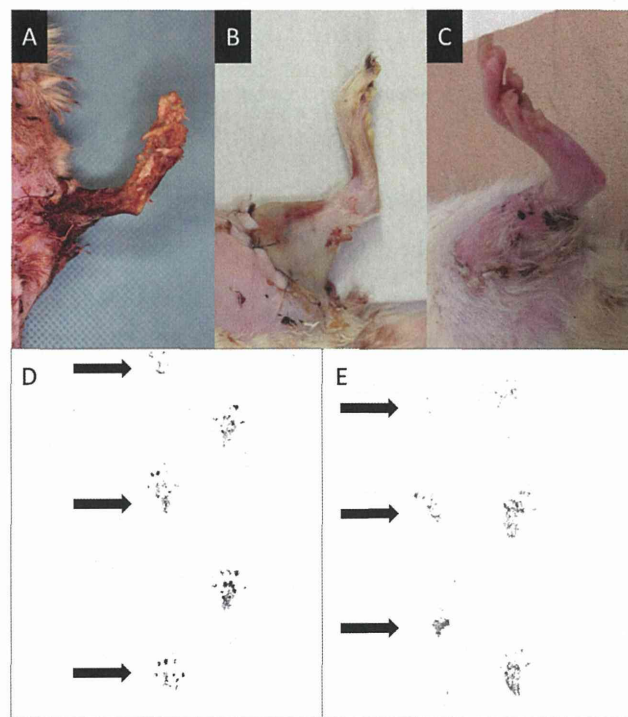


FIGURE 1. Postoperative macroscopic photographs and functional outcome. The limb preserved by wet and 4-C cold condition showed necrosis within three days of surgery (A). The limb perfused by ETK only had blood circulation the day after surgery (B), but the animals were dead three days later because of body strength loss and lack of feeding, likely derived from ischemia-reperfusion injury. Limbs perfused by ETK + HbV showed excellent blood circulation and survived two weeks post operation (C). In addition, functional examination showed the rats could walk using the replanted limb at postoperative 3 months (E), although it was not perfect compared to normal rat (D). ETK, extracellular-trehalose-Kyoto; HbV, hemoglobin vesicles

## 5. 医薬品医療器機総合機構(PMDA)事前面談

### 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」は、平成26年度が最終年度である。当初は実施企業への技術移転により実用化を促進することを見込んでいたが、実施企業を見出すことが出来なかった。しかし、来年度以降も公的資金を受けて、非臨床試験(GLP)を経て医師主導の臨床研究を進める計画を検討することにしたので、これまでの成果と課題について、明らかにし、また当方の方針が妥当かどうかを検討するため、PMDAの事前面談を受けた。

### B. 方法

日時：2015年1月13日 15:00 – 15:45

面談者：

酒井 宏水 (奈良県立医科大学 教授)

PMDA側担当者名(敬称略): (大阪) 川村郁夫、平田雅一、内藤彩矢子、秋田晶平、(東京) 高見廣行、谷之口貴光、仲井友子、ほか

### C. 結果

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。来年度以降も公的資金を受けて、非臨床試験(GLP)を経て医師主導の臨床研究を進める計画を検討しているが、次の項目について御助言を頂きたい。

1) 本製剤の滅菌法について。人工赤血球は微粒子(250nm)のため、フィルタ濾過滅菌法が採用できない。ガンマ線は製剤を変性させる。β-プロピオラクトン(BPL)を使う薬液滅菌法を検討したが、芽胞に対しては不完全であり、またヘモグロビンの変性が判明した。そこで、無菌化した原薬の導入か

ら最終製剤まで完全な無菌雰囲気にて製造することにより製剤の無菌化を達成する方針に切り替えて製造している。そして規定の無菌試験法により最終製品が無菌であることを確認している。本製剤は懸濁した液体なので、規定に従い、培地を新しい培地に植継ぐ方法により無菌であることを確認している。本製剤を用いて医師主導の臨床研究(first in human)を目指すことに、どのような課題があるか。またその先の開発段階でどのような課題があるか。

現在はシンガポールの検査受託会社に委託して実施しているため、米国の薬局方(USP)に従って実施している。提出した試験データについて事前面談では質問に答えることはできない。今後は日本薬局方に記載の方法を確認して対面助言に臨むべき。

2) 人工赤血球の成分はヒト由来ヘモグロビンであるが、NAT検査済みの献血液で使用期限が過ぎたものやALT検査落ちを用いているので、ウィルスは実質上無い。安全性を高めるため、精製工程に加熱処理(60℃, 12時間)とナノフィルトレーションを採用している。2007年にCharles River社に検査委託をして、バリデーションのデータが得られている。今後公的資金を受けて医師主導の臨床研究までを想定した場合に、ウィルス否定試験により最終製品にウィルスが無いことを確認すれば良いか。ウィルス不活化・除去工程のバリデーションはこの段階でも必要か。

医師主導臨床試験も企業主導の臨床試験も、GCPで実施されるものであり、製剤に求められる安全性は全く同じである。溯及調査が必要であり、供給元である日赤と安全情報について連携をとって進めるべき。またナノフィルトレーションの材質や孔径については日進月歩で変化しており、方法が変わればバリデーションも再度必要になる場合もありうる(提示したデータについては事前面談