

S-12-3 人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体の体内動態解析に基づく安全性評価

崇城大学薬学部¹⁾, 熊本大学薬学部²⁾, 奈良県立医科大学³⁾, 慶應義塾大学医学部⁴⁾

小田切優樹¹⁾, 田口和明¹⁾, 丸山 徹²⁾, 酒井宏水³⁾, 小林絃一⁴⁾

TEL: 096-326-3887 FAX: 096-326-5048 E-mail: otagirim@ph.sojo-u.ac.jp

ヘモグロビン小胞体 (HbV) は、前臨床試験において優れた物理化学特性や赤血球と同等の効果を示す一方、体内動態の詳細は十分に明らかにされていない。特に、HbV の場合、赤血球代替物であるため、その投与量は通常のリボソーム製剤の 100 倍以上と多く、一般的なりボソーム製剤の動態解析データを安易に当てはめられない。このためには、新たに臨床使用状況下での体内動態データを構築する必要がある。

このような背景の下、我々は HbV の基本的動態特性を把握するため、まずマウスとラットを用いて、HbV の内部 Hb 及び膜構成成分のコレステロールをそれぞれ¹²⁵I 及び³H で標識して血中滞留性や体内蓄積性等を調べた。その結果、HbV が長期間にわたり生体蓄積性がなく、かつ薬効を発揮するに十分な血中滞留性を示すことを認めた。次いで、出血性ショックモデルラットを作成し、大量出血時における動態特性を調べ、主要分布臓器や排泄経路が健常時と同様な挙動を示すことを確認した。さらに、カンクイザルに単回投与して、生体反応性と血中動態の結果から安全性を確認した。また、アニマルスケールアップの結果より、ヒトにおける HbV の半減期は約 96 時間と予測した。加えて、PEG 修飾リボソーム投与時では ABC (Accelerated Blood Clearance) 現象が認められているが、HbV を健常および出血性モデルラットに繰り返し大量投与した際には、ABC 現象が認められなかった。

上述したように、HbV は健常時及び病態時でも十分な代謝・排泄性を有しており、生体蓄積性もなく、動態学解析の結果から高い安全性が評価され、実用化に向けた早期の臨床試験が待たれる。

S-12-4 人工赤血球製剤による救命救急の可能性

防衛医科大学校免疫微生物¹⁾, 防衛医科大学校集中治療部²⁾, 防衛医科大学校救急部³⁾,

防衛医科大学校生理学⁴⁾, 防衛医科大学校防衛医学⁵⁾, 防衛医学研究センター外傷研究部門⁶⁾,

奈良県立医科大学化学⁷⁾

木下 学¹⁾, 高瀬凡平²⁾, 田中良弘³⁾, 西川可穂子³⁾, 萩沢康介⁴⁾, 柳川隼平⁵⁾, 斎藤大蔵⁶⁾, 酒井宏水⁷⁾,

関 修司¹⁾

TEL: 04-2995-1541 FAX: 04-2996-5194 E-mail: manabu@ndmc.ac.jp

【はじめに】近い将来に想定される大震災では、同時大量発生する外傷患者への輸血の需要増と輸送網寸断による血液供給不足から輸血用血液の極端な欠乏が予想される。本邦で開発中の細胞型人工赤血球は血液型に関係なく輸血出来、長期保存が可能であるため、大規模災害時のとくにプレホスピタルでの出血性ショック患者の救命に有用と考える。しかし出血性ショックでは末梢血管が虚脱しプレホスピタルでの血管確保は極めて困難となる。人工赤血球は粒子径が 200nm と本来の赤血球より小さく骨髄輸血に適していると考えられた。そこで、人工赤血球の骨髄輸血による出血性ショックへの救命効果を検討した。

【方法】マウスに出血性ショックを作製し、人工赤血球やマウス洗浄赤血球、アルブミンの骨髄輸血・輸液による蘇生を試み、その効果を静脈内投与と比較検討した。

【結果】アルブミンを静脈内投与しても低ヘモグロビン血症により救命率は 30% に留まった。しかし人工赤血球やマウス洗浄赤血球の静脈内輸血では低ヘモグロビン血症が改善し救命率は 80% 以上に達した。一方、骨髄輸血に関しては、人工赤血球の骨髄輸血では人工赤血球が速やかに循環血中に移行し低ヘモグロビン血症が改善して有効な救命効果が得られたが(80%)、洗浄赤血球の骨髄輸血では循環血中への移行が悪く低ヘモグロビン血症が改善せずアルブミンの骨髄輸液と同程度の救命率に留まった(30%)。

【結語】細胞型人工赤血球では骨髄輸血が可能となり、本来の赤血球輸血を上回る救命蘇生効果が得られ、プレホスピタルでの出血性ショック患者の救命に有効性が示唆された。人工赤血球は来るべき大震災への有用な備えとなることが期待された。

S-12-5 人工赤血球製剤の臨床応用を目指して：動物モデルを用いた検討

さいたま市立病院呼吸器外科¹⁾、奈良県立医科大学化学教室²⁾、
埼玉医科大学総合医療センター呼吸器外科³⁾、慶應義塾大学医学部⁴⁾
堀之内宏久¹⁾、酒井宏水²⁾、泉陽太郎³⁾、饗庭丁⁴⁾、勢司泰久⁴⁾、小林絏一⁴⁾
TEL：048-873-4111 FAX：048-873-5451 E-mail：twoeseight@gmail.com

われわれは人工酸素運搬体として献血血液より分離したヒトヘモグロビンをリン脂質膜で被包化したヘモグロビン小胞体 (HbV) を開発してきた。HbV は血流中では血漿相に分布し、赤血球に代わって血液の粘性の維持、血管の内腔を保持して血圧を安定させることが可能で、単位血液あたりの酸素運搬量を増加し、通常は赤血球が通過できず、Plasma flow のみで灌流される虚血部位や、未熟な血管で支配される腫瘍部位にも酸素を供給する能力を持っている。われわれは臨床で予想される種々の状態を動物モデルを用いて再現し、人工酸素運搬体が生体に与える影響と、治療に応用できるかについて検討を重ねてきた。HbV を大量投与する際の右心系の変化、長期の観察についてビーグル犬を用いて検証を行い、右心系への影響が一時的なものであること、長期の観察で臓器、組織への影響が大きくはなく、血液生化学的所見に問題がないこと、成長にも影響を及ぼさないことを確認した。また、体外循環時の Priming fluid として用いることにより、高次脳機能を維持できることを確認し、新生児、乳児期の開心手術に使用できる可能性を示した。腫瘍に対する治療応用として HbV が腫瘍を酸素加するかを検討し、C57 mouse に Lewis lung cancer を移植したモデルを作成、HbV の静脈内投与により腫瘍を酸素加できること、酸素化した腫瘍に照射を行い放射線の抗腫瘍効果を増強することを明らかにした。長期に保存でき、血液型にかかわらず使用できる人工酸素運搬体は、血液代替のみならず、多くの疾患の治療においても利用範囲はまだまだ広がってゆくものと考えられる。

Program

第4会場 (扇の間)

[ランチョンセミナー4] 12:00 ~ 13:00

人工臓器の基礎と周術期血糖管理への展開

座長： 小野 稔 (東京大学大学院医学系研究科 心臓外科)

LS4-1 ベッドサイド型人工臓器の基礎とその有用性

西田 健朗 (水俣市立総合医療センター 代謝内科)

LS4-2 心臓手術症例における人工臓器の適用と臨床的意義

川人 宏次 (自治医科大学病院 心臓血管外科)

共催：日機装株式会社

[ワークショップ2] 13:15 ~ 14:55

人工赤血球製剤の効力と安全性

座長： 小林 紘一 (慶應義塾大学医学部外科)

酒井 宏水 (奈良県立医科大学化学教室)

WS2-1 人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) 製剤の開発状況

酒井 宏水 (奈良県立医科大学化学教室)

WS2-2 人工赤血球の免疫応答への影響に関する検討

東 寛 (旭川医科大学小児科)

WS2-3 ヘモグロビン小胞体の体内動態解析に基づく安全性・有効性評価と DDS への応用

小田切優樹 (崇城大学薬学部)

WS2-4 肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の効果と安全性

河野 光智 (慶應義塾大学医学部呼吸器外科)

WS2-5 人工赤血球製剤を用いた組織保存研究：移植外科・形成外科領域への応用の可能性

荒木 淳 (東京大学医学部形成外科)

WS2-6 妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた治療法の開発

太田 英伸 (国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 知的障害研究部)

東京大学心臓外科¹、同 重症心不全治療開発講座²、同 臓器移植医療部³

奈良県立医科大学化学教室

小野 稔¹、縄田 寛¹、木下 修¹、木村 光利¹、根本真理子³、加賀美幸江³、遠藤美代子³、絹川弘一郎²

酒井 宏水

「補助人工心臓と心臓移植は車の両輪である。」これを唱える人はいないであろう。心臓移植の現状はどうだろうか。1967年12月に第1例目が行われて以来、国際心肺移植学会の報告数だけで10万例を超えた。5、10年生存率は75%、60%に近づきつつあり、長期予後は25年に及んでいる。数万例のデータベースに基づいた、治療成績・リスク解析・QOL解析が毎年報告されている。重症心不全治療の中で最もevidenceの確立された外科治療である。年間症例数は5000～6000例と推定されている。補助人工心臓 (VAD) 治療の現状はどうだろうか。(体外設置型であるが) 救命例は、1967年のDeBakeyによる人工心肺離脱困難の症例が最初である。1980年代には第1世代であるNovacorが登場し、植込み型VADの本格的治療が開始されたが、1年を超える補助は極めて困難であった。1990年代後半の第2世代の連続流VADの臨床導入 (MicroMed DeBakey) は重症心不全治療に大きな変革をもたらした。技術革新は瞬く間に進み、第3世代の連続流VADでは非接触型回転や小型化が実現された。連続流VADの生存率は1年で70%に及ばない時代から始まり、15年経過した現在では2年生存率が75%を超えようとしている。5年生存率が75%を超える時代は目前に来ている。成績の向上はDT治療の爆発的普及を促し、年間植込み数は増加の一途をたどり、昨年は3000例を超え、年間5000例に達する年はそう遠くない。欧米ではこのように両者は車の両輪として十分に機能している。翻って、わが国の成績は移植、VADともに欧米より良好であり、心臓移植の10年生存率は90%、VADの2年生存率は85%以上である。しかし、わが国の植込み型VADはBTT適用しか保険償還の対象にならず、VAD治療の持っているポテンシャルを活用しているとは言い難い。例えて言えば、片輪がパンクした車を運転しているような状態である。是非とも、周知を集めて、わが国において移植とVADが肩を並べる時代を切り拓くべきである。

輸血代替の創製を目的として開発されて来た人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) 製剤は、血液と同等の酸素運搬機能をもつ濃厚な微粒子分散液である [平均粒子径: 250 nm, [Hb] = 10g/dL, 粒子占有体積 (Hctに相当): 40% 程度; 酸素親和度 (P50) = 25-28 torr]。日本赤十字社から研究用として譲渡を受けた非使用赤血球 (期限切れ) をもとに、加熱処理とナノフィルトレーションを経て高純度・高濃度Hbを調製し、リン脂質小胞体内に封入する。この時点で「ナマモノ」から「物質」に変換されたといえる。Hb小胞体は、赤血球と類似のカプセル構造によりNO捕捉などHbの副作用を遮断する。我々は厚生労働科学研究として本製剤の製造法を確立するとともに、非臨床試験により有効性と安全性について詳細に検討して来た。出血性ショック蘇生液として、また体外循環回路補填液としての有効性などを明らかにするとともに、製剤の特性 (小粒子径、酸素親和度の制御、比較的高い粘性、CO結合性) を活かし、輸血では対応の出来ない疾患や治療など、新しい臨床応用の可能性も実証してきた。他方、人工赤血球製剤の安全性については、投与量が一人当たり数リットル以上になることも想定されるので、生体に対する影響を注意深く検討してきた。欧米ではいわゆる修飾ヘモグロビンの開発が進展したが、NO捕捉による副作用のため臨床試験の段階で中断している。ヘモグロビンが赤血球の中に封じ込まれている生理学的理由から、同様の細胞型構造が好ましいと考えられる。本シンポジウムでは、人工赤血球の微粒子分散液にどのような特徴があるのか、また、これまでに明らかになった輸血代替としての効力と安全性について理解を深めていきたい。

WS2-2 人工赤血球の免疫応答への影響に関する検討

旭川医科大学小児科¹、日本赤十字社北海道ブロック血液センター²、
福島県立医科大学学生化学³

東 寛¹、藤原 満博²、高橋 大輔³、酒井 宏水³

我が国で開発されている人工赤血球は、ヒトヘモグロビン分子を脂質2重膜(リポソーム)に包埋したものであり、広義の意味でリポソーム製剤である。HbVに使用されているリポソームは、血球成分および血漿成分への直接的な影響は調べ得た限りで観察されておらず、優れた生体適合性を有している。HbVの血液代替物としての投与を想定すると、極めて大量のリポソームを投与する必要がある。リポソームはその特性として、生体に投与されると肝臓・脾臓等の細網内皮系の細胞に補足されることから、それらを大量に補足した細網内皮系の細胞には何らかの変化が生じる可能性がある。一方、細網内皮系の細胞は、免疫応答を制御する細胞としても機能する。そこで、リポソームを投与したラットから脾臓を摘出し、非特異的マイトージェンであるConcanavalin Aあるいは蛋白抗原であるKLHの刺激による脾リンパ球の増殖反応を検討した。その結果1)リポソームを投与後の脾リンパ球では、刺激に対する増殖反応が一過性に抑制される。2)この現象はリポソーム投与後1週間で完全に解除される3)T細胞の増殖を抑制しているのはリポソームを貪食した脾マクロファージである。4)抑制効果にはNOの産生が関与していること、5)cell-to-cell contactが必要である、6)in vivoでの抗体産生反応(抗KLH抗体産生反応)には影響を与えない等を明らかにすることができた。これらの結果は、リポソームの大量投与がT細胞免疫応答の変調をきたすことがあったとしても、あくまで一過性であること、およびin vivoにおけるB細胞の抗体産生反応には影響を与えないことを示唆している。従って、免疫機能への影響という観点から見ても、HbVは優れた生体適合性を有していると結論できる。

WS2-3 ヘモグロビン小胞体の体内動態解析に基づく安全性・有効性評価とDDSへの応用

崇城大学薬学部¹、熊本大学薬学部²、奈良県立医科大学医学部³、
慶應義塾大学医学部⁴

小田切優樹¹、田口 和明¹、丸山 徹²、酒井 宏水³、
小林 紘一⁴

ヒト赤血球由来の精製ヘモグロビン(Hb)を高濃度で内包させた細胞型人工酸素運搬体Hb小胞体(HbV)は、優れた物理化学特性と生理作用に基づき人工酸素運搬体としての利用が期待されている。ところで、現在、医薬品開発においては莫大な費用と長い期間を要する。それにも拘わらず、上市される新薬は極めて少ない。この一因として、種差を含めた薬物体内動態特性解析の不十分さが挙げられる。事実、過去に有望視された人工酸素運搬体の一種、パーフルオロカーボン¹は臓器蓄積性等の点から開発には至らなかった。HbVについても、従来のリポソーム製剤と異なり、高投与量ゆえ、体内動態の基礎情報に加え、臨床状況下での動態データを構築する必要がある。このような背景の下、我々はHbVの内部Hbを¹²⁵Iで、膜成分の一つであるコレステロールを³Hでラベル化したHbV標識体をマウスやラットなどの小動物に投与して体内動態の基本事項を明らかにした。次いで、HbVの適用疾患である大量出血時において併発される出血性ショックモデルラットを作成し、大量出血時におけるHbVの体内動態を評価した。その結果、主要分布臓器や排泄経路は健常時と同様なプロファイルを示し、生体蓄積性も確認されなかった。一方、出血ショック時では、消失半減期の短縮が認められたものの、末梢血量の減少に伴う臓器への移行性の向上によるものと推察され、臓器中の低酸素状態を改善している可能性が示唆された。さらに、HbVの臨床応用の適用拡大に関する基礎的検討の一環として、HbVにCOを付加したCO-HbVを作製し、HbVの新規CO運搬体としての可能性を評価した。具体的には、健常マウスにCO-HbVを投与して血清生化学パラメータと臓器障害性を調べ、安全性を確認した。この知見に基づき特発性肺線維症(IPF)モデルマウス(プレオマイシン誘発モデル)を作製し、肺線維化を評価した。その結果、HbV投与群において顕著な線維化の進行がみられたのに対し、CO-HbV投与群ではその進行の抑制が確認された。また、肺機能への効果について検討したところ、肺機能悪化の抑制が確認され、CO-HbVがIPFの新規治療法になる可能性が強く示唆された。

WS2-4 肺切除術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の効果と安全性

慶徳義塾大学医学部呼吸器外科¹、さいたま市立病院呼吸器外科²、奈良県立医科大学医学部化学教室³

河野 光智¹、神山 育男¹、松田 信作¹、渡辺 真純¹、堀之内宏久^{1,2}、酒井 宏水³、小林 紘一¹

【背景】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リポソームで、輸血用ヒト赤血球よりヘモグロビンを抽出、精製、ウイルス不活化を行った後、リポソームに内包、膜表面を PEG 修飾して粒径を 250nm、P50 は 32Torr に調製した粒子である。血液中で酸素運搬体として機能することは、動物の交換輸血試験で確認され、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。将来、手術中の出血に対する臨床応用も見込まれている。【目的】肺切除術期に大量出血する動物モデルとして、マウスに 40% 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た。保存血などと比較して HbV 投与の有効性と安全性を検討した。【方法】マウスで循環血液量の 40% を試料溶液で交換した後、人工呼吸器下に左肺全摘術を施行する。輸血、輸液を替え以下の 4 群を作成する。(1) Lactate Ringer 溶液 (LR) 群、(2) 5% アルブミン生食液 (rHSA) 群、(3) マウス保存血液 (sRBC) 群、(4) ヘモグロビン小胞体分散液 (HbV) 群：HbV を 5% アルブミンに分散した液体。Hb 濃度は 8.6 g/dl に調整する。術後 7 日目まで観察を行い、血中のサイトカイン測定を行った。主要臓器での低酸素誘導因子 (HIF)-1 α の発現を免疫染色で評価した。【結果】LR 群は全例が死亡した。rHSA 群は生存率が 50% であったのに対し、sRBC 群と HbV 群では全例が生存した。sRBC 群や HbV 群では体重の減少率が低く、回復が早い傾向を認めた。TNF- α などの炎症性サイトカイン濃度は、HbV 群と sRBC 群とで同等であった。HbV 群では肝臓および腎臓での HIF-1 α の発現が sRBC 群と同等に抑制された。【考察】左肺全摘による呼吸機能低下状態でも HbV が有効に機能したと考えられた。外科的侵襲からの回復過程に深刻な影響を与えず、明らかな炎症の惹起も認められなかった。HbV 投与は肺切除手術での出血に対しても有効であると考えられた。

WS2-5 人工赤血球製剤を用いた組織保存研究：移植外科・形成外科領域への応用の可能性

東京大学医学部形成外科¹、奈良県立医科大学 医学部 化学教室²、名古屋大学医学部 乳腺・内分泌外科³

荒木 淳¹、酒井 宏水²、武内 大³、田代 絢亮¹、光嶋 勲¹

背景：切断肢再接合術および移植手術を行う際、血液還流が途絶してから血管吻合手術によって血液が再環流されるまでの虚血時間は、移植後の組織および臓器の機能ばかりでなく個体の生死にも大きな影響を及ぼす。四肢の場合、手関節および足関節より近位の大切断に関しては 46 時間が限度とされており、心臓では 4 時間、小腸で 6 時間、肝臓で 8 時間程度が限界とされている。人工赤血球ヘモグロビン小胞体 (HbV) は、その酸素運搬能力により、代替血液としてだけでなく、臓器組織保存液としての応用の可能性がある。我々はこの虚血限界時間を延長すべく基礎実験を行っている。方法：全身麻酔下にラット左後肢を完全に切断し、大腿動脈より灌流液にて常温保存し、8 時間後に大腿動脈および神経を顕微鏡下に吻合して再接合術を行った。灌流液は京都大学で開発された臓器保存液 ET-Kyoto および ET-Kyoto と HbV を 1 対 1 で混合したものを、大腿静脈から得られた還流液を血液ガス分析にて比較した。また術後の経過を従来の冷温保存のものと比較した。結果：血管吻合および再接合手術自体は全例で可能であった。HbV を用いたものは 3 匹中 2 匹で長期生存しており、ET-Kyoto のみのものは術後数日で死亡するか移植片壊死に陥った。冷温保存のものは術後 2 日以内に 5 例全例死亡した。静脈からの灌流液において、HbV を用いたものは ET-Kyoto を用いたものより pO₂ が低く、酸素が HbV により有効に運搬され消費されていることが示唆された。考察：臓器および組織の虚血時間は手術の可否だけでなく術後の機能にも大きくかわるため、良好な保存法の開発が待たれている。臓器および組織ごとの最適条件など、まだ未解明な部分が多いが、人工赤血球製剤を用いた保存液の開発は、その選択肢の一つとして期待されている。

WS2-6 妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた治療法の開発

国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 知的障害研究部¹、東北大学病院 周産母子センター²、崇城大学 薬学部³、理化学研究所 光子工学研究領域 画像情報処理研究チーム⁴、早稲田大学 先進理工学部 生理・薬理研究室⁵、奈良県立医科大学 医学部 化学教室⁶

太田 英伸¹、李 コウ¹、中川真智子³、若松 永憲¹、泉 仁美¹、稲垣 真澄¹、岡村 州博³、小田切優樹³、横田 秀夫⁴、柴田 重信⁵、酒井 宏水⁶、八重樫伸生⁶

輸血の代用として開発されてきたヘモグロビン小胞体(人工赤血球)は、期限切れのヒト赤血球からヘモグロビンを精製濃縮し、リン脂質小胞体に内包した小球粒子(直径250nm)である。これまでの私達の研究から、妊娠ラット・モデルにて慢性投与された人工赤血球が細網内皮系で適切に代謝され、妊娠母体・胎児ともに副作用を与えないことが確認された。私達は更に研究を進め、人工赤血球を妊娠高血圧症候群(PIH: pregnancy-induced hypertension)の治療に応用する検討を開始した。これまでのPIH治療開発では、胎盤の血流不全の原因であった子宮螺旋動脈の狭小化を誘導する生理機構を解明し、動脈狭小化を防ぐ戦略が取られてきた。しかし関連因子の同定は難しく、「妊娠高血圧症候群」に対する根本的な治療法は現在確立していない。そこで私達は視点を変え、これまでの「胎盤形成期における螺旋動脈の狭小化に対する「予防治療」でなく、胎盤形成後の既に狭小化した螺旋動脈に対応する「対処治療」を開発した。具体的には、ラットPIHモデルにて、狭小化した螺旋動脈でも通過可能なナノマイクロ・サイズの人工赤血球にて胎盤に酸素供給を行い、低酸素状態を解除することにより、胎児脳を保護できるかどうか、胎児発育を促すことができるかどうか、検討を行った。

WS3-1 内径に応じた脱細胞血管内腔特性の設計戦略

国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部¹、大阪工業大学生体医工学部²

山岡 哲二¹、藤里 俊哉²、馬原 淳²

【緒言】人工血管におけるPET(ポリエチレンテレフタレート)繊維とゴアテックスTMの守備範囲は明確であり、その血液との相互作用は詳細に検討されてきた。ダクロン繊維の織りや蛇腹構造、あるいは内腔のペロア構造化など、タンパク質吸着や血小板粘着の充進につながるものであり、一方、ePTFEはその高い疎水性のために、タンパク質吸着性・細胞接着性が低く、小児BTシャントに限られるが直径3mm人工血管も市販されている。このように、相反する性質であるが、いずれも人工血管の有用性に寄与する。国内外で研究が進んでいる脱細胞組織に関しては、生体に類似しているからと云う理由で、望ましい性質を有しているかのように論じられることが多い。コンプライアンスマッチングに関しては是であるが、その他全てがそうではない。ターゲットとする血管の口径によって、その戦略は大きく異なる。【実験】国立循環器病研究センターでは、10000気圧という超高压で処理した後に洗浄することで、構造タンパク質の力学強度を保持したまま細胞成分を除去できることを見出し、直径7mm程度以上のミニブタ下行大動脈の脱細胞化と同種ミニブタへの移植実験の優れた効果を報告してきた。内径2mmの小口径血管への適応として、ダチョウの頸動脈を同手法により脱細胞化しミニブタFFバイパス手術にて評価した。【結果と考察】大口径血管に関しては優れた開存性と、さらに、動物の成長に応じた組織の成長を示唆する結果も得てきた。同種同所性移植であるためのマトリックスの同等性は確実であり、構成成分のコラーゲンやエラスチンと細胞との相互作用にも優れている。一方で、小口径血管は早期に閉塞した。コラーゲンは止血剤としても使用されるほど血液凝固能が高いことは周知であり、従って小口径血管には向かない。口径3mmのPET繊維性血管が存在しないことから理解できる。そこで、我々は、血中循環血管内皮前駆細胞捕捉界面を構築することで、国内外で例を見ない口径2mm長さ30cmという小口径脱細胞化血管の開存に成功したので報告する。

第 1 日 目 平成26年12月8日(月)

9 : 25 開会の辞

9 : 30-10 : 15 基調講演 [司会：小林 絃一 (慶応義塾大学)]

人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) 製剤の特徴と実用化に向けた試み

酒井 宏水 (奈良県立医科大学)

= 準備 5 分 =

10 : 20-12 : 00 シンポジウム 1 「人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) 製剤の効能と安全性」

[司会：酒井 宏水 (奈良県立医科大学), 堀之内 宏久 (さいたま市立病院)]

10 : 20-10 : 40 S1 人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) を構成する脂質 2 重膜のもつ免疫調節効果について
東 寛 (旭川医科大学)

10 : 40-11 : 00 S2 病態モデル動物におけるヘモグロビン小胞体の体内動態と安全性評価
田口 和明 (崇城大学)

11 : 00-11 : 20 S3 出血性ショックにおける致死性不整脈発生機序とリボソーム封入人工酸素運搬体の効果に関する実験的検討
高瀬 凡平 (防衛医科大学)

11 : 20-11 : 40 S4 外科周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の効果と安全性
河野 光智 (慶応義塾大学)

11 : 40-12 : 00 S5 ラット後肢移植モデルを用いた人工赤血球の有用性に関する検討
荒木 淳 (東京大学)

12 : 00-12 : 40 理事会 (10 階 31000 会議室)

12 : 40-13 : 10 評議員会 (10 階 31000 会議室)

13 : 15-13 : 45 総会

13 : 45-14 : 15 大会長講演 [司会：東 寛 (旭川医科大学)]

人工酸素運搬体 "HemoAct™" の開発

小松 晃之 (中央大学)

14 : 15-15 : 55 シンポジウム 2 「人工酸素運搬体の新物質戦略」

[司会：小松 晃之 (中央大学), 丸山 徹 (熊本大学)]

14 : 15-14 : 35 S6 ミオグロビンを用いた人工酸素運搬体の開発戦略
根矢 三郎 (千葉大学)

14 : 35-14 : 55 S7 完全合成化合物による酸素錯体の形成とその薬物動態
北岸 宏亮 (同志社大学)

14 : 55-15 : 15 S8 HemoAct™ の血液適合性および安全性評価
春木 理沙 (中央大学)

15 : 15-15 : 35 S9 Size Effect of Hemoglobin-Albumin Microspheres on Cellular Uptake and Cell Viability
Yao-Tong Lai (東京大学)

15 : 35-15 : 55 S10 酸素マイクロ・ナノバブル分散液を用いた完全液体換気への応用
垣内 健太 (早稲田大学)
= 休憩 10 分 =

16 : 05-16 : 35 一般演題 1 [司会：田口 和明 (崇城大学)]

16 : 05-16 : 20 G1 (ヘモグロビン-アルブミン) クラスター "HemoAct™" の分子構造調節
山田 佳奈 (中央大学)

16 : 20-16 : 35 G2 ポリリン酸修飾ヒアルロン酸ゲルを用いた新規局所止血材の開発
迫田 龍 (神奈川工科大学)

16 : 35-17 : 20 特別講演 [司会：武岡 真司 (早稲田大学)]

How Does Hemoglobin (Hb) Regulate its Oxygen-Affinity and Cooperativity?

Takashi Yonetani (Univ. of Pennsylvania)

17 : 45-19 : 45 懇親会 (10 階 31008 室)

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の特徴と実用化に向けた試み

酒井宏水

奈良県立医科大学 医学部 化学教室

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、現行の医療に多大の貢献をしている。しかし、少子高齢化社会により献血液の需給バランスが崩れることが懸念されているし、緊急時や大規模災害時の救命医療においては、血液型検査、感染の可能性、短い保存期限などが、危機管理体制の不安要素になりうる。人工赤血球(Hb小胞体)は感染源を含まず、血液型が無く、長期間の備蓄ができ、現行の輸血治療を補完する技術として期待されている。更に、脆弱な赤血球と比べ化学的に安定で、物性値の調節が可能なので、輸血では対応のできない疾患の治療や外科的治療への可能性も検討されている。

Hb小胞体の特徴は、①日赤から提供されたNAT検査済み非使用赤血球を原料とし、加熱処理(ウイルス不活化)とナノフィルトレーション(ウイルス除去)を経た高純度Hbを用いている(ウシ、ブタ由来Hbの使用も可能)、②粒子表面のPEG修飾と脱酸素化により保存期間中の化学的安定性を確保できる、③細胞型構造により内因性NOとの反応を抑制し血管収縮と血圧亢進を生起しない、血管外漏出の防止など、裸のHbの毒性をカプセルで遮蔽できる、④血液適合性が高く、老化赤血球と同様に最終的に細網内皮系に捕捉され支障なく分解、排泄される、⑤微粒子(250nm)のため血漿層に均一に分散して流動し、赤血球が通過しにくくなった毛細血管なども通過でき、脳梗塞や有茎皮弁の虚血性領域、腫瘍組織にも酸素を運搬出来ること、⑥高いHb濃度(10g/dL)により、出血性ショック、あるいは制御不能出血に対する投与では赤血球輸血と同等の酸素運搬効果(蘇生効果)を示す、他方、⑦CO結合Hb小胞体の投与では、COの徐放により細胞保護効果を示す、⑧摘出小腸や切断下肢などの酸素運搬灌流液として有効である。これらの効能、大量投与時の安全性について、膨大な非臨床成績が蓄積され、ほぼ全てが学術誌などに公表されている。製造法もここ数年で簡略化が進んでいる。これまでアカデミア中心で研究を進めてきたHb小胞体制剤は、いよいよ次の段階に進むべき医薬品の候補物質であると考えている。

日本には半世紀以上に及ぶ「人工血液」開発の歴史があるが、未だ十分な性能のものは実用化されていない。人工赤血球は特定生物製剤に分類されることもあり実用化までのハードルが高いものの、人工赤血球が必要であることは明白であり、関連諸機関の協力も得て、是非とも日本発の医薬品として実用化に繋げたい。

【謝辞】

本研究の推進にあたり、実に多くの諸先生のご協力を頂いている。本研究は、厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)を受けて推進されている。

【関連文献】

1. 酒井宏水, 土田英俊. 人工赤血球の過去, 現在, 未来. *ファルマシア* 2009;45:23-8.
2. Sakai H, Takeoka S, Kobayashi K. Gas bioengineering using hemoglobin-vesicles for versatile clinical application. *Curr Pharmaceut Design* 2011;17:2352-9.
3. 酒井宏水, 堀之内宏久, 東寛, 小田切優樹, 小林絃一. 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の安全製試験. *人工血液* 2013;21:36-48.
4. 酒井宏水. 人工赤血球の開発状況と将来展望. *Anesthesia Network* 2014;18:37-41.
5. 高折益彦. 細胞型人工酸素運搬体の治験, 第1相計画. *人工血液* 2011;19:3-11.

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)を構成する脂質2重膜のもつ免疫調節効果について

○東 寛¹, 酒井宏水²¹旭川医科大学, ²奈良県立医科大学

我が国の人工酸素運搬体は、脂質2重膜(リポソーム)にヒトヘモグロビンを内包した、いわゆる細胞型人工赤血球で、Hemoglobin vesicle (HbV) と呼称されている。その酸素運搬能は、ヒト赤血球のそれと遜色がない。実際に脱血モデル動物を用いた実験では血液代替物として安全に使用できることが示されている。しかしながら、赤血球輸血の代替となるには、リポソーム製剤での投与量を遥かに越える量のリポソームを投与することになる。そのために、大量投与に伴う生体反応が様々な角度から検討されてきた。その結果、生命に危険を及ぼす重大な副作用や、軽微であっても長期に持続する無視できない副作用は観察されておらず、そのすぐれた生体適合性が示されてきた。一方で、一般にリポソームは、細網内皮系に速やかに取り込まれることから、特に大量投与した場合に、免疫応答に何らかの影響を与える可能性がある。この観点からリポソーム大量投与が脾細胞の免疫応答へ与える影響について詳細に検討を行ってきた。その結果 1) HbV あるいは空リポソームを投与後の脾細胞は Con A 刺激に対する増殖が抑制されている。2) リポソームを貪食した脾マクロファージが T 細胞の増殖を抑制する機能を一過性に獲得する。3) T 細胞の増殖抑制にはマクロファージと脾 T 細胞との接触が必要である。4) 増殖抑制にはマクロファージの産生する NO が関与している。5) HbV の投与は *in vivo* に於ける抗体産生反応を抑制しないこと等を明らかにしてきた。これらは、主として、T 細胞の増殖に焦点をおいた解析であり、サイトカイン・ケモカインの産生動態がいかなる影響を受けるのかについての詳細な検討はなされてこなかった。そこで、脾細胞の Con A 刺激下での培養中に反応系に分泌されてくるケモカイン・サイトカインの動態がリポソーム投与後にどのように影響を受けるのかについて詳細に検討を加えた。その結果、一部のサイトカイン・ケモカインは、リポソームの投与後に、産生量が増加するという結果を得た。さらに、IL-1b の産生量を指標にして、脾細胞の LPS 刺激に対する反応性に与えるリポソームの影響も検討したが、LPS に対する反応性はリポソーム投与により変化しないという結果が得られた。これらの結果から、リポソームにより、T 細胞の増殖は一過性に抑制を受ける可能性がある一方で、サイトカイン・ケモカインの産生の観点からは、少なくとも産生の低下はなく、かつ、自然免疫系の過剰な反応が誘導される可能性は低いと推定される。

病態モデル動物におけるヘモグロビン小胞体の体内動態と安全性評価

○田口和明¹、丸山 徹²、酒井宏水³、小田切優樹¹¹ 崇城大学薬学部、² 熊本大学薬学部、³ 奈良県立医科大学

【緒言】 人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体(HbV)は大量出血時の他、外科的手術中の血液補充としての利用が期待されている。そのため、HbVは万人へ安全かつ有効に使用することが必要不可欠であると考えられる。これまでに我々は、HbVの体内動態における基盤情報と臨床使用状況下でのデータを構築し、HbVの安全性・有効性を評価してきた。本講演では、病態モデル動物を用いたHbVの体内動態特性と安全性について紹介する。

【実験】 出血性ショックモデルラットは全血液量の40%を脱血することで作製した。四塩化炭素誘発慢性肝障害モデルラットは、ミネラルオイルに溶解した四塩化炭素(CCl₄: mineral oil=1:4)を週3回、8週間腹腔内投与し作製した。高脂血症モデルマウス(ApoE欠損マウス)は九州より購入した。体内動態の検討は、HbVの内部ヘモグロビンを標識した¹²⁵I-HbVまたは脂質膜を標識した³H-HbVを用い評価した。

【結果と考察】 出血性ショック時におけるHbVの体内動態を評価したところ、主要分布臓器や排泄経路は健常時と同様のプロファイルを示し、生体蓄積性も確認されなかった。四塩化炭素誘発慢性肝障害モデルラットにおいて体内動態評価を行ったところ、肝障害が悪化するにつれて、肝臓への分布量及びKupffer細胞の貪食能低下が生じる結果、血中クリアランスは低下し、また、肝実質細胞が障害を受けることで、排泄量の低下が起こることが示唆された。このような体内動態の変動は生体に悪影響を及ぼす可能性が懸念されるため、生化学的及び病理組織学的検討を行ったところ、HbV投与により一時的な血漿パラメータの変動や臓器へのヘモジデリンの沈着はあるものの、著しい悪影響は確認されなかった。さらに、高脂血症モデル動物としてApoE欠損マウスを用いHbV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、HbV投与により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、HbVは十分な代謝排泄性を有していることが確認された。

【結論】 以上、体内動態特性解析の結果より、HbVは健常時のみならず、代謝・排泄能が低下した状態や出血性ショック時においても、十分な代謝・排泄性を有しており、生体蓄積性はないことが示唆され、様々な臨床使用条件下においても安全に使用できると考えられた。

【文献】

- 1) Taguchi K et al. *J Control Release*. **2009**, *136*, 232-9.
- 2) Taguchi K et al. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2010**, *248*, 234-41.
- 3) Taguchi K et al. *J Pharm Sci*. **2011**, *100*, 775-83.
- 4) Taguchi K et al. *Drug Metab Rev*. **2011**, *43*, 362-73.

シンポジウム1 S3

出血性ショックにおける致死性不整脈発生機序とリボソーム封入人工酸素運搬体の効果に関する実験的検討

○高瀬凡平, 田中良弘, 東村悠子, 木下 学

防衛医科大学校集中治療部, 救急部, 免疫微生物学

出血性ショック心臓では致死性不整脈が発生しやすい。その機序検討するとともにリボソーム封入人工酸素運搬体(Hemoglobin-Encapsulated Liposome [LHb])の効果を実験的に検討した。

【方法】 1) SD rat に 85% 脱血致死性出血性ショック状態を作成し、洗浄赤血球(RBC)蘇生した群(n=14)と、5%アルブミン(5%Alb)蘇生した群(n=14)及び LH b 群(n=14)で蘇生した群の 3 群間で心拍変動指標(LF, HF, LF/HF)及び血中 norepinephrine (NE) を測定した。
2) SD rat に 30% 再出血性致死性ショックを作成し、RBC 群(n=14)、5%Alb 蘇生群(n=14)及び LH b 群の 3 群間の摘出心で Optical Mapping System (OMP) の興奮伝播・Action potential duration dispersion (APDd)、致死性不整脈性を検討した。

【結果】 1) RBC 群及び LHb 群では LF/HF・NE が正常に対し 5%Alb 群では上昇し、全例死亡した。2) 5%Alb 群では OMP で左心室伝導遅延と burst pacing による心室細動が全例で誘発され APDd 値が増大した。RBC 群及び LH b 群では認めなかった。

【結語】 出血性ショック心臓では、自律神経活動異常・細胞的心筋不整脈性増大から致死性不整脈が誘発されると示唆された。また、リボソーム封入人工酸素運搬体(LHb)は洗浄赤血球と同様の効果が期待される可能性が考えられた。

外科周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の効果と安全性

○河野光智¹，神山育男¹，松田信作¹，渡辺真純¹，堀之内宏久^{1,2}，酒井宏水³，小林絃一¹

¹慶應義塾大学医学部呼吸器外科，²さいたま市立病院呼吸器外科，³奈良県立医科大学医学部化学教室

【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リボソームで、輸血用ヒト赤血球よりヘモグロビンを抽出、精製、ウイルス不活化を行った後、リボソームに内包、膜表面をPEG修飾して粒径を250nm、P50は32Torrに調製した粒子である。血液中で酸素運搬体として機能することは、動物の交換輸血試験で確認され、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。将来、手術中出血に対する臨床応用も見込まれている。

【目的】 肺切除周術期に大量出血する動物モデルとして、マウスに40%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た。保存血などと比較してHbV投与の有効性と安全性を検討した。また、ラットに対して肺切除術を行い、同時に循環血液量の30%を脱血するモデルでは、観血的動脈圧モニタリングを行い、HbVが循環動態に及ぼす影響を評価した。

【実験】 マウスで循環血液量の40%を試料溶液で交換した後、人工呼吸器下に左肺全摘術を施行する。輸血、輸液を替え以下の4群を作成する。(1) Lactate Ringer 溶液(LR)群、(2) 5%アルブミン生食液(rHSA)群、(3) マウス保存血液(sRBC)群、(4) ヘモグロビン小胞体分散液(HbV)群：HbVを5%アルブミンに分散した液体。Hb濃度は8.6g/dlに調整する。術後7日目まで観察を行い、血中のサイトカイン測定を行った。主要臓器での低酸素誘導因子(HIF)-1 alphaの発現を免疫染色で評価した。ラットモデルでは頸動脈にカニューレを挿入後、人工呼吸器に接続して左肺を切除する。カニューレより循環血液量の30%を脱血する。脱血量と等量のHbVを頸静脈ラインから輸液する。その間、動脈圧の連続モニタリングを継続し記録する。閉胸し手術を終了して人工呼吸器から離脱する。血圧モニタリングは術後1時間まで継続した。

【結果と考察】 マウスモデルのLR群は全例が死亡した。rHSA群は生存率が50%であったのに対し、sRBC群とHbV群では全例が生じた。sRBC群やHbV群では体重の減少率が低く、回復が早い傾向を認めた。TNF-alphaなどの炎症性サイトカイン濃度は、HbV群とsRBC群と同等であった。HbV群では肝臓および腎臓でのHIF-1 alphaの発現がsRBC群と同等に抑制された。肺切除後のラットの平均血圧は105±30mmHgであった。30%の脱血により45±1mmHgまで低下したが、HbVの投与により速やかに血圧は上昇し回復した。投与後10分での血圧は120±20mmHgであった。その後も血圧は1時間以上維持され、閉胸して手術を終了し、人工呼吸器からの離脱も可能であった。

【結論】 マウス及びラット左肺全摘モデルにおける呼吸機能低下状態でもHbVが有効に機能した。外科的侵襲からの回復過程に深刻な影響を与えず、明らかな炎症の惹起も認められなかった。HbV投与は肺切除手術での出血に対しても有効であると考えられた。

ラット後肢移植モデルを用いた人工赤血球の有用性に関する検討

○荒木 淳¹、酒井宏水²、武内 大¹、加賀谷優¹、内藤宗和³、光嶋 勲¹

¹東京大学医学部形成外科、²奈良県立医科大学医学部化学教室、³愛知医科大学解剖学

【緒言】 外傷による切断四肢の再接着手術を行う際、切断されてから再接着されるまでの虚血時間や保存状態が、その生着の成否や術後の機能予後に大きくかかわってくる。また、切断部位が近位であり、切断端に筋肉が多く含まれる場合には、血流再開時の再灌流障害が大きな問題となる。これに対し現在は冷却保存しておくしか対処法がないため、我々は人工赤血球「ヘモグロビン小胞体(HbV)」を用いた新たな組織保存法の開発を目指し、共同実験を進めている。

【実験】 ラット後肢の大腿動静脈および大腿神経を温存しつつ大腿骨幹部レベルで完全切断し、切断端の大腿動脈より従来の臓器保存液「ET-Kyoto」およびHbVを用いた組織保存液を灌流した。大腿静脈からの還流液を採取し、血液ガス分析を行った。一定時間灌流保存を行った後、顕微鏡下で大腿動静脈および大腿神経を吻合し、切断肢再接着術を施行し、総虚血時間が8時間となるように血液を再灌流した。また手術後3か月までの生着と機能を評価した。

【結果と考察】 大腿静脈還流液の血液ガス分析において、灌流前よりも pO_2 が著明に減少し溶存酸素が組織内で使われており、また「ET-Kyoto」よりもHbVにおいて有意に pO_2 は低値を示した。また、虚血時間4、5、6時間の時点においてLactateもHbVにおいて有意に低値であり、HbVを用いると好氣的代謝が保たれていると考えられた。長期的な生着に成功したのはHbVを用いたもののみであり、3か月後の機能回復も良好であった。

【結論】 人工赤血球の組織保存液としての応用の可能性が示唆された。今後、従来の臓器保存液との比較や再接着後の長期機能予後の検討などを行っていく必要がある。本法は、肝・腎・心・肺・小腸・顔面・四肢・喉頭・子宮などの同種移植医療にも応用が可能であり、使用用途はますます広がっていくものと思われる。

【文献】

- 1) Araki J, Sakai H, Takeuchi D, Kagaya Y, Naito M, Mihara M, Narushima M, Iida T, Koshima I. Normothermic preservation of the rat hind limb with artificial oxygen-carrying hemoglobin vesicles. *Transplantation, in press (TPA-2014-0748)*.

