

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 臨床研究・治験推進研究事業
(英語) Project Promoting Clinical Trials for Development of New Drugs

研究開発課題名： (日本語) 備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究
(英語) Storable Artificial Red Cells for Clinical Emergency Use

分担研究開発課題名： (日本語) 人工赤血球製剤の GMP 製造法の確立、非臨床 GLP 安全性試験
(英語) Establishment of GMP production procedure of artificial red cells and preclinical GLP studies

研究開発担当者 (日本語) 公立大学法人 奈良県立医科大学・教授・酒井 宏水
所属 役職 氏名： (英語) Nara Medical University・Professor・Hiromi SAKAI

分担研究開発課題名： (日本語) Hb-V の肝臓及び腎臓における薬物代謝酵素・トランスポーターの誘導または阻害に関する検討
(英語) Effect of artificial red cells on drug-metabolizing enzymes and transporters in liver and kidney

研究開発担当者 (日本語) 崇城大学薬学部・教授・小田切 優樹
所属 役職 氏名： (英語) Sojo University Faculty of Pharmaceutical Sciences・Professor・Masaki OTAGIRI

分担研究開発課題名： (日本語) (i) Hb-V 構成リポソームによる抑制性マクロファージの誘導機序の分子基盤の解析、(ii) 人工赤血球製剤の臨床治験に向けたプロトコル作成
(英語) (i) Study on induction of suppressive macrophages by liposomes, (ii) Planning of first-in-human study of artificial red cells

研究開発担当者 (日本語) 旭川医科大学 小児科・教授・東 寛

所属 役職 氏名: (英語) Asahikawa Medical University・Professor・Hiroshi AZUMA

分担研究開発課題名: (日本語) 人工赤血球製剤の術中出血に対する投与手順

(英語) Study on perioperative usage of artificial red cells in animal models

研究開発担当者 (日本語) 東海大学医学部外科学系呼吸器外科学・准教授・河野 光智

所属 役職 氏名: (英語) Tokai University School of Medicine・Associate Professor・Mitsutomo KOHNO

分担研究開発課題名: (日本語) 人工赤血球の緊急投与を想定した動物試験

(英語) Study on emergency usage of artificial red cells in animal models.

研究開発担当者 (日本語) 防衛医科大学校 免疫微生物学講座・准教授・木下 学

所属 役職 氏名: (英語) National Defense Medical College・Associate Professor・Manabu KINOSHITA

分担研究開発課題名: (日本語) 出血性ショック心臓における心機能と不整脈発生頻度に及ぼす人工赤血球の影響に関する研究

(英語) Effect of artificial red cells on shock heart syndrome and suppression of arrhythmia

研究開発担当者 (日本語) 防衛医科大学校 集中治療部・准教授(臨床教育教授) 部長

所属 役職 氏名: (英語) National Defense Medical College・Associate Professor・Bonpei TAKASE

実施期間: 平成28年4月1日 ~ 平成29年3月31日

II. 成果の概要(総括研究報告)

(和文)

本研究では、人工赤血球(ヘモグロビン ベシクル, Hb-V)製剤の実用化を目指している。使用期限の過ぎた非使用赤血球(廃棄血)を、感染源を含まず、血液型がない人工赤血球に「再生」できる。危篤的出血に対し輸血が間に合わない状況で、備蓄しておいた Hb-V を投与して生命の危機を乗り切ることができれば、医療上の必要性は極めて高い。これまでに、Hb-V の基本的な製造法を確立し、動物投与試験により安全性と有効性に関する膨大な知見を得ている。Hb-V の生体適合性、酸素輸送効果、保存安定性などは、他者の追随を許していない。しかし、原料となるヒトヘモグロビンは高度に純化したものであるが、現行の薬事法では特定生物由来製剤とみなされ、開発のハードルが高い

こと、医療機関で発生する期限切れ赤血球を集めるシステムが無いこと、また大規模自然災害等における緊急時の危機管理対策と本製剤の必要性が日本では十分に認識されないことが、製薬企業の開発意欲を削ぐ要因となっている。そこで、これまで開発を進めて来た研究者が主体となって、外注企業を活用しながら製造と非臨床試験を進め、治験への橋渡しを目指している。

平成 28 年度は、前年度に引き続き、繰り返し Hb-V の製造を行い、SOP の見直しを重ねた。PMDA 対面助言を受け、非臨床 GLP 安全性試験の基本的方針を固め、単回投与毒性試験（ラット）から開始、中枢神経系(FOB)に及ぼす影響の検討試験(ラット)、薬物動態試験(ラット)も実施した。また、H29 年度実施予定の単回投与毒性試験(イヌ)では、安全性薬理試験の呼吸器系、心血管系についても同時に評価すること、免疫原性試験、反復(間歇)投与試験等の方針を決定した。また、First-in-human の治験プロトコルの骨子を作成した。

先見的安全性研究としては、(i) 腎臓を対象とし、健常ラットに Hb-V を投与した後の薬物代謝酵素(CYP, 抱合酵素など)や薬物トランスポーターについて、網羅的に解析したところ、影響は殆どないことが推察された。(ii) Hb-V を捕捉した脾臓マクロファージが免疫抑制機能を獲得する機序の解明については、Hb-V を捕捉したマクロファージから産生される NO が T 細胞の増殖抑制に関与している可能性が示唆された。

先見的有効性試験では、(i) 昨年度確立した急性易出血病態モデル(家兔)を用い、更に肝損傷を加え致死性の自由出血とした。Hb-V の投与では赤血球輸血と同様に血圧が保たれ、血小板補充により止血率も高い値を示した。(ii) Hb-V による出血性ショックの蘇生(ラット)では、Shock heart syndrome 心臓の催不整脈の抑制効果を示す。再分極過程における活動電位の不均一性の指標である action potential duration dispersion (APDd)が、Hb-V の蘇生では延長しないことが要因と考えられた。(iii) 周術期出血を想定した、侵襲の大きい肝切除・周術期出血モデルを作成した。また、外科的侵襲と虚血再灌流障害、拒絶反応の 3 つの負荷がかかる、同所性気管移植モデルを作成した。これらのモデルについて Hb-V の投与試験を開始した。

(英文)

This research project was conducted to produce artificial red cells (hemoglobin vesicles, Hb-V) aiming for clinical use. Outdated donated RBCs can be regenerated as artificial red cells that are free from contamination of pathogens and blood type antigens. Under emergency circumstances, when blood transfusion is not available, it is expected that injection of stored Hb-V can save the lives of patients. We have established the basis for production processes and have conducted safety and efficacy evaluations through preclinical trials. The Hb-V biocompatibility, oxygen transporting capacity, and stability during storage are unrivaled. Nevertheless, pharmaceutical companies feel reluctant to develop such products because 1) they are categorized as biological products comprising highly purified human derived Hb, 2) there is no system to collect outdated blood from hospitals nationwide, and 3) people are not aware of the necessity for this product in emergency situations and catastrophic natural disasters. In this project, we, the academic researchers who have developed this product to date, proceed with the production of this product and preclinical studies using the outsourcing of specialized companies for the next stage of development.

During fiscal year 2016, production of Hb-V was repeated to confirm the standard operation procedure. According to comments from the Pharmaceutical and Medical Devices Agency (PMDA, Japan), the

fundamental concept and protocols of GLP preclinical studies were decided. Some of toxicological, pharmacokinetic, and neurological studies were conducted using rats. Meanwhile a draft protocol of first-in-human trial was prepared.

Safety evaluations included the following: (i) metabolic enzymes (CYP, conjugation enzymes) and drug transporters in rat kidneys were unaffected after Hb-V bolus injection; (ii) a transient immunosuppressive effect observed in splenic macrophages was clarified as related to NO production of macrophages that suppress T-cell growth.

Efficacy evaluations included the following: (i) Efficacy of Hb-V was confirmed by injecting to a lethal shock model with hemorrhage and thrombocytopenia using rabbits, yielding results comparable to those of RBC transfusion. (ii) The mechanism of the suppressive effect of Hb-V on arrhythmia in shock heart syndrome was clarified as inhibited extension of the action potential duration dispersion. (iii) Highly invasive perioperative animal models were established with hepatectomy, pneumectomy, and trachea transplantation for evaluation of Hb-V injection during the next fiscal year.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2件、国際誌 13件）

1. Nagao S, Taguchi K, Miyazaki Y, Wakayama T, Chuang VT, Yamasaki K, Watanabe H, Sakai H, Otagiri M, Maruyama T. Evaluation of a new type of nano-sized carbon monoxide donor on treating mice with experimentally induced colitis. *J Control Release*. 2016 Jul 28;234:49-58.
2. Tokuno M, Taguchi K, Yamasaki K, Sakai H, Otagiri M. Long-Term Stored Hemoglobin-Vesicles, a Cellular Type of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier, Has Resuscitative Effects Comparable to That for Fresh Red Blood Cells in a Rat Model with Massive Hemorrhage without Post-Transfusion Lung Injury. *PLoS One*. 2016 Oct 31;11(10):e0165557.
3. Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Yamasaki K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound hemoglobin vesicles ameliorate multiorgan injuries induced by severe acute pancreatitis in mice by their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Int J Nanomedicine*. 2016 Oct 27;11:5611-5620.
4. 太田英伸、加賀麻衣子、李コウ、酒井宏水、岡村州博、八重樫伸生. 人工酸素運搬体は妊娠高血圧症候群ラットモデルの胎盤低酸素・胎仔発育不全を治療する. *人工血液* 24, 63-72 (2016).
5. Kure T, Sakai H. Transmembrane Difference in Colloid Osmotic Pressure Affects the Lipid Membrane Fluidity of Liposomes Encapsulating a Concentrated Protein Solution. *Langmuir*. 2017 Feb 14;33(6):1533-1540.

6. Rikihisa N, Watanabe S, Satoh K, Saito Y, Sakai H. Photosensitizer Effects of Artificial Red Cells on Dye Laser Irradiation in an Animal Model Assuming Port-Wine Stain Treatment. *Plast Reconstr Surg*. 2017 Mar;139(3):707e-716e.
7. Naito Y, Sakai H, Inoue S, Kawaguchi M. Hemoglobin Vesicles prolong the time to circulatory collapse in rats during apnea. *BMC Anesthesiol*. 2017 Mar 14;17(1):44.
8. Sakai H. Overview of Potential Clinical Applications of Hemoglobin Vesicles (HbV) as Artificial Red Cells, Evidenced by Preclinical Studies of the Academic Research Consortium. *J Funct Biomater*. 2017 Mar 15;8(1). pii: E10.
9. Taguchi K, Yamasaki K, Maruyama T, Otagiri M. Comparison of the pharmacokinetic properties of hemoglobin-based oxygen carriers. *J Funct Biomater*. 2017 Mar 15;8(1). pii: E11.
10. Rikihisa N, Watanabe S, Saito Y, Sakai H. Artificial red blood cells as potential photosensitizers in dye laser treatment against port-wine stains. *J Funct Biomater*. 2017 Apr 13;8(2). pii: E14.
11. Azuma H, Yoshida Y, Takahashi H, Ishibazawa E, Kobayashi H, Sakai H, Takahashi D, Fujihara M. Liposomal microparticle injection can induce myeloid-derived suppressor cells (MDSC)-like cells in vivo. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2017 Apr 05; 39(3):140-147.
12. Yamada M, Sakai H. Hidden antioxidative functions of Reduced nicotinamide adenine dinucleotide coexisting with hemoglobin. *ACS Chem Biol* (in press)
13. Kohno M, Hashimoto R, Izumi Y, Watanabe M, Horinouchi H, Sakai H, Kobayashi K, Iwasaki M, et al. Acute 40% exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles in a mouse pneumonectomy model. *PLoS One* (in press)
14. 酒井宏水、太田英伸、小林紘一、八重樫伸生. 人工赤血球（ヘモグロビンベシクル）. 研修ノート No. 100 「産婦人科医療の近未来」(印刷中)
15. Taguchi K, Yamasaki K, Sakai H, Maruyama T, Otagiri M. The use of Hemoglobin-vesicles for delivering medicinal gas for the treatment of intractable disorders. *J Pharm Sci* (in press)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Hiromi Sakai / Translational Research of hemoglobin vesicles as a transfusion alternative, 口頭 / TechConnect 2016 World Innovation Conference & Expo / Washington DC / May 22-25, 2016、 国外

2. Hiromi Sakai / Artificial Red Cells as a Transfusion Alternative and for Oxygen and Carbon Monoxide Therapeutics, ポスター / BIO2016 International Convention (San Francisco) / 2016/06/06, 国外
3. Bonpei Takase, Yuko Higashimura, Yoshihiro Tanaka, Kenichi Hashimoto, Haruka Asahina / The Significant Role of Action Potential Duration Dispersion in Lethal Arrhythmia in Shock Heart Syndrome in Severe Hemorrhagic Model: Analysis by Optical Mapping System, 口頭 / 第 63 回日本不整脈心電学会学術大会 / 札幌コンベンションセンター / 2016.7.14, 国内.
4. Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Otagiri M, Maruyama T / Therapeutic application of a new type of nano-sized carbon monoxide donor in colitis model mice, ポスター / 2016 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition, 2016/7/17-20, 国外.
5. 東 寛 / 招待講演「membrane-derived microvesicle による免疫抑制細胞(MDSC)の誘導について」 / 第 68 回北日本小児科学会 (コーヒーブレイクセミナー) / 2016.9.10, 国内.
6. 河野光智 / 高酸素親和性ヘモグロビン小胞体投与のラット肺切除周術期出血に対する効果, ポスター, / 第 68 回日本胸部外科学会定期学術集会 / 2016.9.29, 国内.
7. 酒井宏水 / 人工赤血球をつくる (輸血代替・酸素治療薬・一酸化炭素治療薬), 口頭 / 「細胞を創る」研究会 9.0 / 早稲田大学国際会議場井深大記念ホール / 2016.10.21, 国内.
8. 木下学 / 教育講演 人工血液を用いた蘇生科学の近未来—人工赤血球、人工血小板を用いた出血性ショック時の止血救命蘇生戦略—, 口頭 / 日本蘇生学会第 35 回大会 / 2016.11.11, 久留米, 国内
9. Hagiwara K, Kinoshita M, Sakai H. / Resuscitation by transfusion with Hemoglobin Vesicles in trauma hemorrhagic shock/coagulopathy rabbits. 口頭 / American Heart Association 2016 Resuscitation Science Symposium. New Orleans,LA. AHA-Ress final program p10. 2016/11/13, 国外
10. Bonpei Takase, Kenichi Hashimoto / Action Potential Duration Dispersion is Still Significant Determinant in Lethal Arrhythmias Even after Successful Resuscitation by Artificial Oxygen Carrier in Hemorrhagic Shock Heart, ポスター / American Heart Association's 2016 Scientific Sessions and Resuscitation Science Symposium / New Orleans / 2016.11.14, 国外.
11. 酒井宏水、小田切優樹、東寛、木下学、高瀬凡平、河野光智、岩本美智子、堀之内宏久、高折益彦、小林紘一 / 備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究, 口頭 / 第 23 回日本血液代替物学会 年次大会 (シンポジウム 1: 人工赤血球製剤の適応と臨床試験) / 早稲田大学西早稲田キャンパス / 2016.11.24, 国内.

12. 河野光智、橋本諒、大岩加奈、中川知己、増田良太、神山育男、堀之内宏久、渡辺真純、酒井宏水、小林紘一、岩崎正之 / ラット肺切除周術期出血における高酸素親和型ヘモグロビン小胞体投与の効果, 口頭 / 第 23 回日本血液代替物学会 年次大会 (シンポジウム 1: 人工赤血球製剤の適応と臨床試験) / 早稲田大学西早稲田キャンパス / 2016.11.24, 国内.
13. 田中良弘、吉村有矢、高瀬凡平、関根康雅、秋富慎司、朝比奈はるか、齋藤大蔵、池内尚司 / 出血性ショックに対する人工酸素運搬体(liposome hemoglobin)による治療, 口頭 / 第 23 回日本血液代替物学会 年次大会 (シンポジウム 1: 人工赤血球製剤の適応と臨床試験) / 早稲田大学西早稲田キャンパス / 2016.11.24, 国内.
14. 橋本賢一、東村悠子、高瀬凡平 / 人工酸素運搬体の心筋活動電位不均一性と致死性不整脈誘発に及ぼす影響: Optical mapping 法を用いた出血性ショック心臓蘇生後における実験的検討, 口頭 / 第 23 回日本血液代替物学会年次大会 / 早稲田大学西早稲田キャンパス / 2016/11/24, 国内.
15. 山田孫平、久禮智子、松平崇、山本恵三、酒井宏水 / ヘモグロビンのメト化を抑制する機能を有する人工赤血球, 口頭 / 第 23 回日本血液代替物学会 年次大会 / 早稲田大学西早稲田キャンパス / 2016.11.24, 国内.
16. 伊賀弓佳、Karin Kettisen、Leif Bulow、酒井宏水 / 赤血球の解糖系が産生する電子エネルギーの活用による人工赤血球(ヘモグロビンベシクル)の機能持続効果, 口頭 / 第 23 回日本血液代替物学会 年次大会 / 早稲田大学西早稲田キャンパス / 2016.11.24, 国内.
17. 東寛、吉田陽一郎、石羽澤恵美、高橋弘典、酒井宏水 / リポソームにより誘導される抑制マクロファージの機能解析, 口頭 / 第 23 回日本血液代替物学会 年次大会 / 早稲田大学西早稲田キャンパス / 2016.11.24, 国内.
18. 松野直徒、孟玲童、庄中達也、大谷将秀、高橋裕之、小原弘道、森戸規之、鈴木智之、田崎嘉一、西川裕司、酒井宏水、東寛、古川博之 / 人工赤血球含有灌流液による心停止ドナー肝体外灌流保存の検討, 口頭 / 第 29 回 代用臓器・再生医学研究会総会 / 北海道立道民活動センターかでの 2・7 / 2017.2.25, 国内.
19. 酒井宏水 / 備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究, 口頭 / 早稲田大学応用化学専攻 褒賞・奨学金授与式 記念講演会 / 早稲田大学理工学部 / 2017.3.9., 国内.
20. 山田孫平、久禮智子、松平崇、山本恵三、酒井宏水 / 抗酸化機能を向上したヘモグロビンを有する人工赤血球, 口頭 / 日本化学会 第 97 春季年会 / 横浜 / 2017.3.16-18, 国内
21. 田口和明、永尾紗理、酒井宏水、山崎啓之、丸山徹、小田切優樹 / 一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の潰瘍性大腸炎に対する有用性評価, 口頭 / 日本薬学会第 137 年会 / 仙台 / 2017/3/24-27, 国内.

22. 山田孫平、久禮智子、松平崇、山本恵三、酒井宏水 / ヘモグロビンの自動酸化を抑制させた人工赤血球, 口頭 / 日本薬学会 第 137 年会 / 仙台 / 2017.3.24-27, 国内
23. Ryo Hashimoto, Mitsutomo Kohno, Masazumi Watanabe, Hirohisa Horinouchi, Hiromi Sakai, Koichi Kobayashi, Masayuki Iwazaki / Immediate effects of systemic administration of high-Oxygen-affinity hemoglobin vesicles in a rat pneumonectomy model, Moderated Poster Presentation /25th European Conference on General Thoracic Surgery / Innsbruck, Austria / 2017/5/30, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 酒井宏水 / 備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤 / イノベーションジャパン 2016 / 東京ビックサイト / 2016. 8. 25-26.
2. 久留米大学 記念講演会 「人工赤血球、人工血小板の開発とこれを用いた出血性ショック時の止血救命蘇生戦略」 2016/9/22
3. 酒井宏水 / 備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤 / BioJapan2016 / パシフィコ横浜 / 2016.10.12-14.
4. 酒井宏水 / 「医学を基礎とするまちづくり(MBT)コロキウム」第2部「新産業創生のための企業との交流相談会」における企業との面談 / 早稲田大学大隈講堂・リーガロイヤルホテル東京 / 2016.11.14
5. 細井裕司 (奈良医大学長) / 「関西医科大学・医学部連合8大学の先端研究発表」で人工赤血球の内容を紹介 / 第1回 関西公立私立医科大学・医学部連合シンポジウム / 大阪大学中之島センター / 2017.2.6

(4) 特許出願

PCT/JP2017/8187、ヘモグロビンのメト化抑制能を有する人工赤血球