

血液を大切に思う

人工赤血球製剤の研究開発に託す



小林 紘一

一般社団法人

血液を大切にする会

代表理事

はじめに

私は1967年に慶應義塾大学を卒業した後、外科学教室の呼吸器外科研究室に入室し1971年より石原恒夫先生の指導の下で呼吸器外科を学んだ。1975年よりマサチューセッツ総合病院でProf. Zapolの下で急性呼吸不全の病態の解明と急性呼吸不全に対する膜型人工肺 (ECMO) による治療に従事し、この時に肺循環と気管支循環について大いに興味を持った。研究室では臨床面において、肺癌に対する外科療法、抗癌剤感受性試験、肺腫瘍に対す

る凍結療法、気管支鏡下マイクロスコーピング法による各種肺疾患の診断と治療効果の判定、CTスキャンガイド下の肺生検、超音波気管支鏡、気管支狭窄に対するレーザー療法やステント療法などに力を注いだ。研究面では、呼吸不全の病態解明のほか、体内への酸素供給を改善する手段を模索する中で早稲田大学理工学教授の土田英俊先生に出会い、以下に記す人工赤血球製剤の共同開発を開始した。

人工赤血球製剤の

共同開発

日本におけるヒトヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体の国策としての研究は、1984年の厚生省血液研究事業（主任研究者：国立予防衛生研究所・松橋直）に遡る。廃棄血液の有効利用が目的の一つであり「血液を大切にする」思いと繋がる。土田先生は、リビ

し（会長：1993-土田英俊、1999-小林紘一、2013-武岡真司、2018-酒井宏水）産官学から多くの会員を集め、現在に至るまで学術的な支援がなされている。

人工赤血球

ヘモグロビン小胞体・HbV

次に人工赤血球による輸血用人工血液製剤の製法の概略と特長について図1に示す。

人工赤血球製剤 (HbV) は、慶應義塾大学医学部呼吸器外科との共同研究が始まった「引用文献(1)、(2)」。1993年から厚生省血液研究事業「代替血液製剤に関する研究」の一つに組み込まれ、1997年からは継続して厚生（労働）科学研究費補助金を受けた（主任研究者：1997-2002 土田英俊、2003-2007 小林紘一、2008-2011 堀之内宏久、2012-2014 酒井宏水）。この間、慶應義塾大学ではHbVの動物投与試験が精力的に行われ、有効性や安全性についての結果が累積された。他方、日本血液代替物学会が1993年に発足

均粒径250 nm)である。原料のHbは日本赤十字社から提供される献血由来の期限切れ赤血球由来であるが、精製に際しHbに一酸化炭素を結合させて安定化し、60℃、10時間の加熱処理とウイルス除去膜処理の組合せで、感染に対する安全性を確保できる。約1500本のPEGを粒子表面に配置することにより小胞体粒子間の凝集抑制と分散安定度の向上の効果が得られ、更に脱酸素化して容器に封入することにより溶液のまま室温にて長期保存が

可能になった。「ナモノ」の血液から高純度Hb溶液を単離し、これを人工赤血球という安定な「物質」に再生したといえる。

非臨床実験を開始

HbVを輸血代替として利用するにあたり重要なのは、赤血球と同様にHbV粒子分散液は膠質浸透圧を持たないので、大量投与に際しては循環血液量を維持するために、血漿増量剤の添加が必要となる。例えば、5%アルブミンの水溶液に分散させた場合の膠質浸透圧は20 mmHg、粘度と浸透圧はほぼ血液と同等になり、循環動態の恒常性に寄与する。HbVの粒径は赤血球の約1/30と小さく、血漿中に均一分散できる。慶應義塾大学呼吸器外科で行われた試験として、HbVでラットの循環血液量の実に90%超過の交換でも血圧が維持され、また血液ガス組成も腎皮質の酸素分圧も正常値を推移することを実証した「引用文献(3)」、「(4)」。また、臨床現場で想定される最大の交換率40%の交換輸血においてもラッ

トは全例が生存し、ヘマトクリット(赤血球体積分率)が1週間で完全に回復した。HbVは最終的に細網内皮系に捕捉され、安全に分解、排泄された「引用文献(5)」、「(6)」。

従って、臨床では術前血液希釈、術中出血分の補給、更に胸部外科手術における人工心肺(体外循環回路)の補充液として利用でき

きることを実証し、Circulation誌に掲載された「引用文献(7)」。

小児患者の体外循環では、無輸血充填とした場合(血漿増量剤の充填)、術中の短時間のHb濃度の低下が脳に障害を与え、術後の知能発達に影響を及ぼすとされており、Hb小胞体を充填液として用いることの利点が期待されている。

図2は、血管内を流動する血球成分と人工赤血球のイメージ図である。

出血性ショック時の蘇生液としての利用も慶應義塾大学で検討され、赤血球と同等の酸素運搬機能を主につ菌類を使用した実験で実証している「引用文献(8)」、「(10)」。

例えば、麻酔状態のラットの循環血液量

の50%を脱血して15分後にHb小胞体を5%に分散させて投与すると、循環動態も血液ガス組成も脱血液の投与と同等に推移した。その後の14日間の観察では、ヘマトクリットが正常値にまで戻ることを確認した。ビートルを用いた出血ショック蘇生試験でも、良好な成績が得られている「引用文献(11)」。

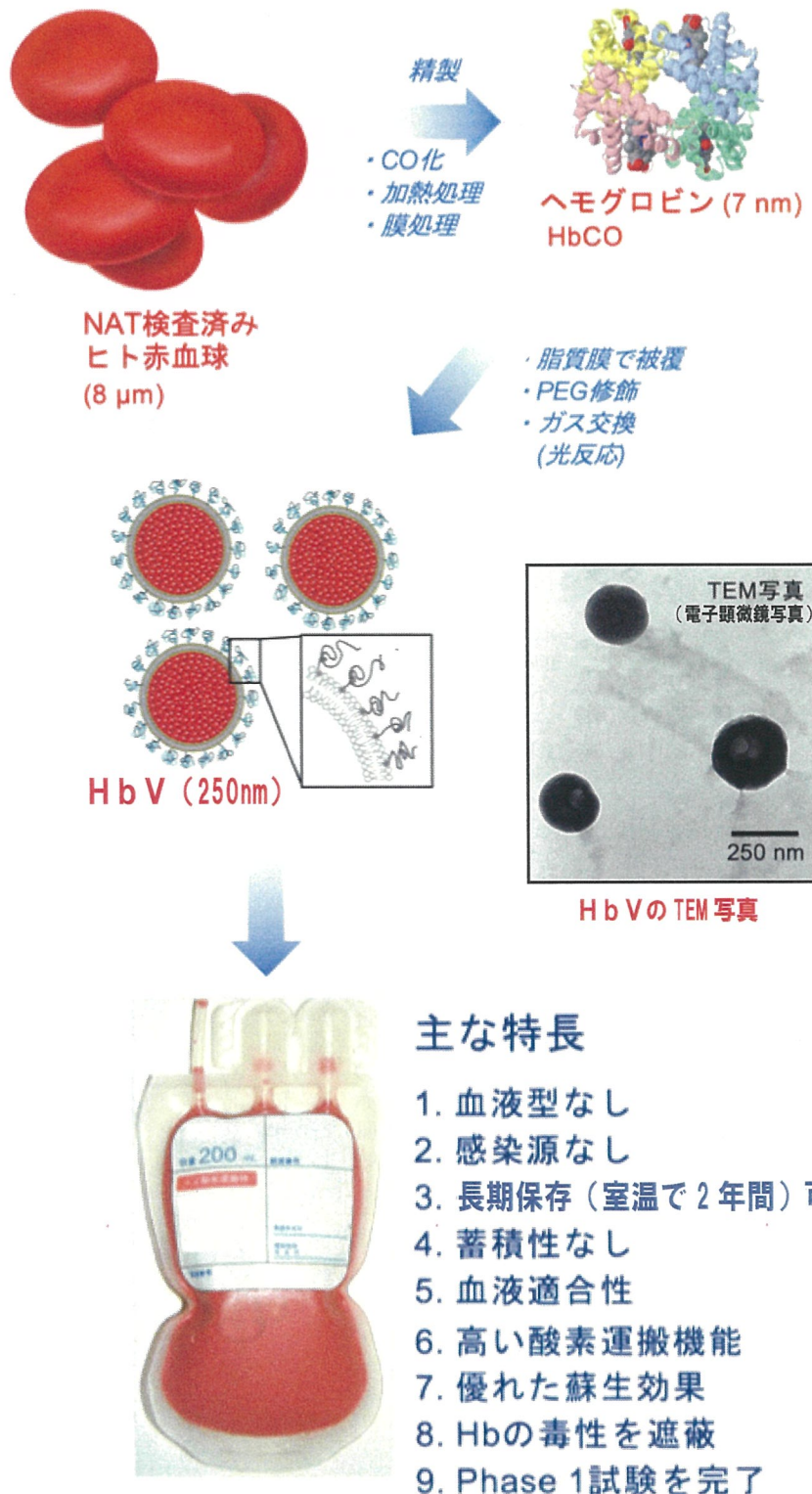


図1. 輸血用人工赤血球製剤の製法の概略と特長

これらの結果は、HbVが医療現場にて使用出来るようになれば、特に救急医療や外科的手術において、血液型不一致や感染の心配をせずに、何時でも要求に応じて投与し、同種血輸血の回避、または必要量の低減が可能と成ることを意味する。このほか、HbVの酸素運搬機能を利用して、低酸素状態にある腫瘍組織の酸素附加により、放射線治療の感受性を高めることにも成功した「引用文献(12)」。

このように、人工赤血球製剤は医療に貢献することが期待されるものの、従来に無い範疇の製剤で、大量投与を前提とし、血液製剤として開発のハードルが高く、日本は総じて危機管理意識が低く、他方、市場性が明確ではないとの見解で製薬企業との共同が困難な状況にある。それでもなお研究目的が明瞭で、実用化されたときの医療への波及効果が絶大なものと期待されるので、早稲田大学の土田英俊先生の研究室出身の、酒井宏水教授（奈良県立医科大学化学教室）が中心となって

本製剤の研究開発を継続した。2013年から現在に至るまで日本医療研究開発機構（AMED：Japan Agency for Medical Research and Development）の支援受け、輸血の代替物としてHbVの安全性・有効性について先見的研究を継続するとともに、医薬品医療機器総合機

構（PMDA）の薬事戦略面談を重ね、製造工程の確立とGLP（Good Laboratory Product）非臨床安全性試験を順次進めた。**臨床治験（Phase II）を開始**
治験（Phase II）を実施するためのAMEDプロジェクト（代表：東寛・旭川医科大学）

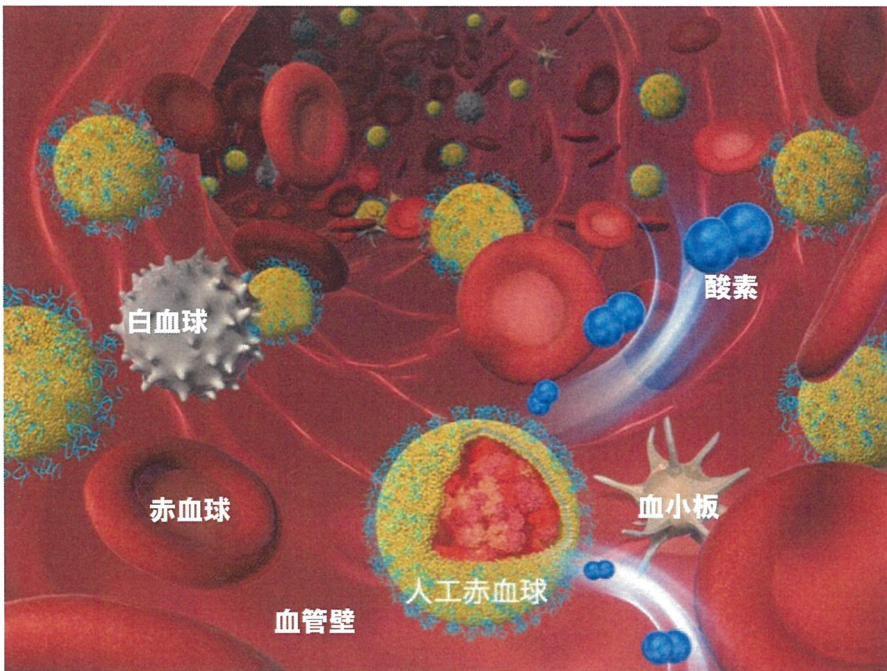


図2. 血管内を流動する血球成分と人工赤血球のイメージ図

が2018年度から始まった。2019年度早期にGLP非臨床試験が終了したことを受け、治験実施施設である北大の倫理委員会の承認を得て、2020年10月から開始された。その結果、重篤な有害事象を認めた例はなかった「引用文献(13)」。いわゆるinfusion reactionや発熱反応が散見されたが、いずれも自然軽快した。欧米で開発された修飾Hbの投与ではNO（一酸化窒素）の捕捉による血圧亢進が問題となったが、HbVでは血圧亢進は無かった。100 mLの投与をした場合の半減期は8-9時間と推定された。血中滞留時間は投与量依存性があることが非臨床試験から解っており、今後の臨床試験において実際の投与量に増大した場合には、半減期は延長されるものと考えられている。本試験の結果から、例えば出血性ショックに対して本製剤を投与する事で、循環ボリュームの確保と酸素運搬体の供給を同時に行うことができ、その結果、既存の血液製剤が届くまで重要臓器の機能を維持し、質の

高い救命ができるものと期待される。これらの成果を踏まえて、2021年度からはAMED橋渡し研究プログラムシリーズB（代表：酒井）として次相の実施に向けた準備を進めている。日本赤十字社の需要調査によれば、産科領域、心臓血管外科領域、外傷治療、へき地・離島医療および輸血専門の専門医による有識者検討会にて検討した結果、最大に見積もつて年間6,100症例、22,700本のHbV製剤の需要があることが試算された。さらに、輸血の代替としての利用のみならず、本製剤の物理化学的利点を活かして酸素治療薬として、虚血性疾患、臓器灌流液への利用、血管腫レーザー治療の標的としての利用、一酸化炭素(CO)キヤリア治療薬として様々な炎症性疾患への利用、さらにはHbVのメト体はシアン中毒解毒剤にも利用できることが動物実験から解っているとのことで、本製剤の医療への貢献は当初予測していたものよりも大きくなるものと考えられ、実用化を大いに期待したい。

最後に、「血液を大切にする会」の閉会にあたり、本会の残余財産80万円を日本血液代替物学会(会長: 酒井宏水)に寄付する事が全会一致で可決され、施行されたことが報じられる。血液を大切にすることを日本血液代替物学会の会員が受け継がれる事を祈念した。

【引用文献】

- (1) T. Satoh, K. Kobayashi, S. Sekiguchi, E. Tsuchida. Characteristics of artificial red cell (Hb encapsulated in poly lipid vesicles). ASAIO J. 38, 580-584 (1992).
- (2) 小林 純一. 人工酸素運搬体の位置づけ. 臨床外科 53, 325-333 (1998)
- (3) Y. Izumi, H. Sakai, K. Hamada, S. Takeoka, Y. Yamahata, R. Kato, H. Nishide, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Physiologic responses to exchange transfusion with

- hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical oxygen tension. Crit. Care Med. 24, 1869-1873 (1996).
- (4) Y. Izumi, H. Sakai, S. Takeoka, T. Kose, K. Hamada, A. Yoshizu, H. Horinouchi, R. Kato, H. Nishide, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model. ASAIO J. 43, 289-297 (1997).
- (5) H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Acute 40% exchange transfusion with Hb-vesicles (HbV) suspended in recombinant HSA solution: Degradation of HbV and erythropoiesis in rat spleen observed for 2 Weeks.

- Transfusion 46, 339-347 (2006).
- (6) H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, E. Ikeda, K. Sou S. Takeoka, M. Suematsu, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusion for 14 days. J. Pharmacol. Exp. Ther. 311, 874-884. (2004)
- (7) Y. Yamazaki, R. Aebe, R. Yozu, K. Kobayashi. Use of hemoglobin vesicles during cardiopulmonary bypass priming prevents neurocognitive decline in rats. Circulation. 114(1 Suppl), 1220-5 (2006)
- (8) H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, M. Yamamoto, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum

- albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. Crit. Care Med. 32, 539-545 (2004).
- (9) H. Sakai, Y. Seishi, Y. Obata, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Fluid resuscitation with artificial oxygen carriers in hemorrhaged rats: Profiles of Hb-vesicles degradation and hematopoiesis for 14 days. Shock 31, 192-200 (2009).
- (10) 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).
- (11) M. Yamamoto, Y. Izumi, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, M. Kohno, M. Watanabe, T. Adachi, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida,

- K. Kobayashi. Systemic administration of hemoglobin vesicles elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. J. Surg. Res. 151, 48-54 (2009).
- (12) M. Yamamoto, H. Horinouchi, Y. Seishi, N. Sato, M. Itoh, K. Kobayashi, H. Sakai, Fluid resuscitation of hemorrhagic shock with Hemoglobin vesicles in Beagle dogs: pilot study. Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol. 40, 179-195 (2012, Feb)
- (13) H. Azuma, T. Amano, N. Kamiyama, N. Takehara, M. Jingu, H. Takagi, O. Sugita, N. Kobayashi, T. Kure, T. Shimizu, T. Ishida, M. Matsumoto, H. Sakai. First-in-human phase 1 trial of hemoglobin vesicles as artificial red cells developed for use as a transfusion alternative. Blood Advances 6(21), 5711-5715 (2022)