

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月16日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300161

研究課題名（和文） 人工赤血球を用いるガスバイオエンジニアリングと医療への応用

研究課題名（英文） Bioengineering of artificial red cells for clinical application

研究代表者

酒井 宏水（SAKAI HIROMI）

早稲田大学・重点領域研究機構・教授

研究者番号：70318830

研究成果の概要（和文）：分子集合体である人工赤血球「ヘモグロビン(Hb)小胞体」の特長は、その物性値を自在に調節できることにある。また新たな機能を粒子に付与することも可能である。本研究では、このテイラーメイド人工赤血球を対象とし、輸血では対応のできない医療技術に応用させる。そして、人工赤血球を用いるガスバイオエンジニアリングを確立する。

研究成果の概要（英文）：One of the characteristics of artificial red cells (hemoglobin-vesicles) as a molecular assembly is that their physicochemical properties can be manipulated. New function can also be added to the particles. In this reasech we take the advantages of such artificial red cells to apply for new clinical indications which blood transfusion cannot be attained. We establish “gas bioengineering” using artificial red cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：人工臓器工学、再生医工学、人工血液、リポソーム、輸血代替

1. 研究開始当初の背景

申請者が一貫して研究して来たHb小胞体は、酸素を結合する蛋白質ヘモグロビン約3万個を脂質膜で包んだ小球粒子(直径：約250 nm)である。その濃厚分散系(体積分率40%, [Hb] = 10 g/dL)の特徴は、(a) 血液型が無い、(b) ウィルスなど感染源が排除されている、(c) 室温で2年以上安定なので備蓄が可能、(d) 大量投与しても代謝系を経て分解排泄される、(e) 血漿中に均一分散して、赤血球が到達できない末梢組織まで酸素を供給する、(f) 出血性ショック蘇生液として、赤血球と同等の酸素

運搬効果と安全性を有する(Sakai et al., *J Intern Med* 2008; *Crit Care Med* 2004; *Transfusion* 2006)。北米で展開された修飾Hb(分子内架橋、重合体)は、血管内皮由来弛緩因子であるNOを捕捉し、血管収縮や血管損傷などの副作用が確認された(Natanson et al., *JAMA* 2008)。(g) 対してHb小胞体は、本来毒性を有するHb分子を脂質膜で被覆しているので、副作用を回避できる(Sakai et al., *J Biol Chem* 2008ほか)。日本の献血-輸血システムは世界的水準にあり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしているが、新興ウィルスなど

感染の可能性や、保存期限が短く緊急時や大規模災害時の危機管理に不安も残る。Hb小胞体の実現されれば、これら輸血の問題点を一挙に解決できる。他方、(h) Hb小胞体は赤血球と比較して意外と安定で溶血も無く、分子集合体として物性値に多様性を持たせ機能修飾ができ、輸血では対応の出来ない新たな臨床応用と、作用機序の解明が学術的に期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、このテイラーメイド人工赤血球を対象とし、輸血では対応のできない医療技術に応用させることを目指す。具体的には、リガンド(配位子: ガス状分子)としてO₂のみならず、COを結合させたHb小胞体の効能と機序の実証、活性酸素種および余剰NOを消去する機能を付与し、再灌流傷害や炎症を緩和させる効果の確認、また、移植臓器の保存灌流液、Tissue Engineeringに用いるO₂供給媒体とするため、溶液組成とレオロジーがコントロールされたHb小胞体のカクテルをデザインする。これらの研究を通して、人工赤血球を用いるガスバイオエンジニアリングを確立する。

3. 研究の方法

① 外因性CO結合-Hb小胞体の投与効果と機序解明: CO結合-Hb小胞体を投与し、微小循環系での血管拡張効果を解析すると共に、炎症/虚血再灌流障害/出血性ショックモデルにおける細胞傷害の抑制の可能性を探索する。

② O₂⁻, H₂O₂, ONOO⁻との反応制御: テイラーメイド人工赤血球の簡便な調製法について検討する。また、Hb小胞体にはmetHb還元酵素系が無いので、活性酸素種との反応による酸化(メト化)に対する防御法を検討する。Tyr-metHb系が疑カタラーゼ活性を呈し、メト化反応を遅延させるので、広くTyr類似体について検討する。また、MB添加による還元可否を予備的に検討する。

③ レオロジー・コントロールと血管反応: Hb小胞体の微粒子分散液は膠質浸透圧がゼロである。従って灌流液として使うには膠質浸透圧を生理条件と同等になるよう、代用血漿剤の添加が必要になる。Albuminのほか、Dextran、Hydroxyethyl Starchに分散させると、微弱な枯渇性相互作用により非ニュートン性の粘弾性挙動を呈し、レオロジー・コントロールが可能となる。血流がもたらす血管壁の剪断応力は、弛緩因子産生に寄与し末梢血液循環を促進し、いわゆるMechano-transductionとして注目される。そこで、血管内皮細胞の培養系の灌流液にHb小胞体分散液を用い、応答遺伝子/蛋白質等発現量などの

解析を試みる(東京大学医学部・山本希美子先生の協力)。

④ 摘出臓器の灌流システムの設計: これまでにマウス摘出小腸の灌流試験を行い、Hb小胞体で灌流した場合に、蠕動運動と上皮細胞の閥門機能が2時間維持できることを実証した。そこで本研究では、他の臓器を検討する。先ず切断下肢の灌流と再接着を試みる(東京大学付属病院・荒木淳先生の協力)。

4. 研究成果

① CO結合-Hb小胞体を出血性ショック蘇生液として投与したところ、肝機能を表す生化学的パラメータALT、AST値の低減が確認された。また、微小血管モデル内を灌流させたときのCO、NO結合速度を計測したところ、Hb溶液系に比較してHb小胞体ではこれが遅延されることから、内因性のCO、NOの捕捉が低減されることも影響していると考えられた。

② これまで活性酸素を低減させる方法としてTyr-metHb系の疑カタラーゼ活性が有望視され、この条件を詳細に検討したものの、持続的に十分な効果が得られなかったため、急速に脂質膜を介したMB電子伝達系の構築を検討した。ラットモデルを使って検討したところ、持続的な還元効果が認められた。更に、酸化ストレスに対する防御機構がラットとは異なり、ヒトにより近い動物種(モルモット)を用いて比較検討したところ、ラットで得られた結果と同等であり、臨床的にも可能であることが示唆された。この研究については、人工赤血球の機能向上に極めて重要であることから、平成25年度以降に新たな研究課題として更に発展的に検討をする予定である。

③ テイラーメイド人工赤血球を効率的に調製する新規手法の検討を行なった。また、微粒子分散流体としての生理学的な影響を検討するため、ガス透過性細管内を流動させた際のガス反応の特徴の解明や、血管内皮細胞に対するHb小胞体の影響をE-selectin、ICAM-1などの炎症性サイトカインおよび一酸化窒素合成酵素eNOSの発現量により評価を行った。特に後者については、Hb溶液系に比較してHb小胞体は粒子径が大きく溶液粘度が高いことにより側方拡散が遅いため、結果としてNOの結合速度や酸素の放出速度を遅くし、血管活性の低減に寄与する可能性があることを明らかにした。また、静置条件だけではなく流動を負荷した状態で細胞を培養することにより、より生体内に近い条件での評価を行なった。硝子基板にヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)を播種・培養し、平行流動負荷装置を用いることにより、Hb小胞体

流体の肌 EC に対する影響を評価した。低 Hb 濃度においては、Hb 小胞体で E-selectin の産生を低減し Hb の毒性を低減し炎症を抑制し細胞に保護的に働いている可能性が示唆された。また、高 Hb 濃度でも、Hb 小胞体が炎症を惹起せず細胞に保護的に働いている可能性が示唆された。

④ラット後肢を一旦切断し、人工赤血球分散液を大腿動脈より灌流し、常温で8時間保存した。保存中、大腿静脈より灌流された保存液の、血液ガス分析を行った。灌流後、同所性に再接合術を行い、移植後の生着・機能を観察した。灌流前に約180mmHgあった保存液中の酸素分圧(pO₂)が、灌流後約20mmHgまで下がり、その後1時間おきの測定にて変化はみられなかった。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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

(原著論文)

K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Maruyama, M. Otagiri. Fourteen-days observation and pharmacokinetic evaluation after massive intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in cynomolgus monkeys. *J. Drug Metab. Toxicol.* 3, 1000128 (2012)

M. Kaga, H. Ohta, Y. Lee, R. Kamii, H. Yamamoto, S. Akiyama, S. Watanabe, T. Matsuda, Y. Kimura, S. Tsuchiya, H. Tei, L. Okamura, H. Sakai, N. Yaegashi. Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusion for 7 days in Pregnant rats and fetuses. *Life Sci.* 91, 420-428 (2012)

H. Sakai, Y. Suzuki, K. Sou, M. Kano. Cardiopulmonary hemodynamic responses to the small injection of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 100, 2668-2677 (2012)

A.G. Tsai, M. Intaglietta, H. Sakai, E. Delpy, C.D. la Rochelle, M. Rousselot, F. Zal. Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier. *Current Drug Discovery Technol.* 9, 166-172 (2012)

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)

H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Removal of Hemoglobin-vesicles from circulating blood by using centrifugation and ultrafiltration. *Artif. Organs* 36, 202-209 (2012)

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)

H. Sakai, N. Miyagawa, H. Horinouchi, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Intravenous injection of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) after hemodilution with a series of plasma expanders (water-soluble biopolymers) in a rat repeated hemorrhage model. *Polymers Adv. Technol.* 22, 1216-1222 (2011)

K. Taguchi, S. Ogaki, H. Watanabe, D. Kadowaki, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, T. Maruyama, M. Otagiri. Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles prevents Esherichia coli growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 337, 201-208 (2011)

D. Takahashi, H. Azuma, H. Sakai, K. Sou, D. Wakita, H. Abe, M. Fujihara, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Nishimura, H. Ikeda. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive in ex vivo culture condition. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 337, 42-49 (2011).

K. Taguchi, Y. Iwao, H. Watanabe, D. Kadowaki, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, T. Maruyama, M. Otagiri. Repeated injection of high dose of hemoglobin encapsulated liposomes (hemoglobin-vesicles) induces accelerated blood clearance in a hemorrhagic shock rat model. *Drug Metab. Dispos.* 39, 484-489 (2011)

H. Sakai, N. Okuda, S. Takeoka, E. Tsuchida. Increased viscosity of hemoglobin-based oxygen carriers retards NO-binding when perfused through narrow gas-permeable tubes. *Microvasc.*

Res. 81, 169-176 (2011).

K. Taguchi, M. Miyasato, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, T. Maruyama, M. Otagiri. Alteration in the pharmacokinetics of hemoglobin-vesicles in a rat model of chronic liver cirrhosis is associated with Kupffer cell phagocyte activity. *J. Pharmaceut. Sci.* 100, 775-783 (2011).

P.K. Ong, S. Jain, B. Namgung, Y.I. Woo, H. Sakai, D. Lim, K.J. Chun, S. Kim. An automated method for cell-free layer width determination in small arterioles. *Physiol. Meas.* 32, N1-N12 (2011, Jan).

S. Miyake, H. Sakai, M. Takaori. Effects of crystalloid and colloid osmotic pressure on HbV (liposome encapsulated hemoglobin) membrane. *Artif. Blood* 18, 128-133 (2010).

S. Miyake, J. Takemura, H. Sakai, M. Takaori. Measurement of electrolyte concentrations in serum containing liposome vesicles. *Artif. Blood* 18, 91-95 (2010).

K. Taguchi, M. Miyasato, H. Ujihara, H. Watanabe, D. Kadowaki, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Maruyama, M. Otagiri. Hepatically-metabolized and -excreted artificial oxygen carrier, hemoglobin-vesicles, can be safely used under conditions of hepatic impairment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248, 234-241 (2010)

(総説など)

T. Sato, T. Fukasawa, T. Komatsu, H. Sakai, S. Ishiwata. Protein-protein interactions in solution and their interplay with protein specific functions. *J. Phys. Soc. Jpn* 81 (suppl.), SA002-1 – SA-002-11 (2012)

H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics. *Curr. Drug Discovery Technol.* 9, 188-193 (2012)

H. Sakai, S. Takeoka, K. Kobayashi. Gas bioengineering using hemoglobin-vesicles for versatile clinical application. *Curr. Pharmaceut. Design* 17, 2352-2359 (2011)

H. Sakai. What is the major mechanism of slower NO uptake by red blood cells? (Letter to Editorial). *J. Biol. Chem.* 286, 1e22, (2011)

H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier, that fulfils the physiological roles of the red blood cells structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 662 (Oxygen Transport to Tissue XXXI) 433-438 (2010)

[学会発表] (計 3 5 件)

(抜粋)

酒井宏水, 鈴木勇司, 宗慶太郎, 狩野真由美 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)をブタに少量投与したときの血行動態に関する検討 / 第 19 回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

酒井宏水 / 人工赤血球/代用血漿剤(水溶性高分子)分散系のレオロジー挙動 / 第 60 回レオロジー討論会 / 名古屋大学 / 2012.9.27-28.

酒井宏水 / リポソーム製剤としての人工赤血球の効率の高い製造法 / 産学官連携推進会議<第 11 回>イノベーションジャパン 2012 / 東京フォーラム / 2012.9.27-28

H. Sakai / Gas Bioengineering of Artificial Red Cells (invited) / 28th Annual Conference, on 40th Anniversary of Faculty of Medicine, Prince of Songkla University / Hat Yai, Thailand / 2012, Aug 8.

H. Sakai / Artificial Red Cells (Hemoglobin-vesicles) as a Cellular-type Hemoglobin-based Oxygen Carrier for Versatile Clinical Applications / BIT's 1st Annual International Symposium of Hematology / Beijing / 2012. June 15-17

H. Sakai, Y. Suzuki, K. Sou, M. Kano / Cardiopulmonary hemodynamic responses to the injection of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs / 9th World Biomaterials Congress / Chengdu / 2012. June 1-5

酒井宏水 / 日本の人工酸素運搬体の歴史と現状 / 第 18 回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.

H. Sakai / Hemoglobin nanoencapsulation favorably retards gas reactions / 2nd anniversary symposium of Waseda Bioscience Research Institute in Singapore / Matrix, Biopolis, Singapore / 2011. 9. 29.

H. Sakai / シンガポールにおける人工赤血球の研究 (WABIOS ランチョンセミナー) / 第 49 回日本生物物理学会年会 / 兵庫県立大 書

写キャンパス / 2011.9.18.

H. Sakai / Hb encapsulation in vesicles retards gas reactions by intracellular diffusion barrier and decreased diffusion of vesicles / 第49回日本生物物理学会年会 / 兵庫県立大 書写キャンパス / 2011.9.16.

H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi / Characteristics of hemoglobin vesicles as a cellular type artificial oxygen carrier / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29

H. Sakai / Hb encapsulation in vesicles retards NO- and CO-binding and O₂-release / International Society on Oxygen Transport to Tissue 2011 / Georgetown Univ., Washington DC, USA / 2011, July 24-27

H. Sakai / Artificial Red Cells (Hb-Vesicles) for a Transfusion Alternative and Oxygen Therapeutics / International Conference on Materials for Advanced Technologies. / Suntec, Singapore / 26 June-1 July, 2011

H. Sakai / Artificial oxygen carriers (Hb-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics / The 5th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering / Kuala Lumpur / 20-23, June 2011 Malaysia

H. Sakai / Developing next generation artificial oxygen carrier (artificial red cells) for versatile clinical application / Drug Discovery World Asia 2011 / Singapore 29-30 March 2011.

酒井宏水 / 人工赤血球：ヘモグロビン小胞体の新しい臨床応用 / Technology Link in WTLO 早稲田大学産官学研推進センター / 早稲田大学 55号館 N棟大会議室 / 2011. 1. 14

H. Sakai / Characteristics of Artificial Red Cells (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics (Invited) / Department of Biochemistry Seminars / Dept. of Biochemistry, School of Medicine, National Univ. of Singapore / 2010. 11. 29

酒井宏水 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の開発状況 (Invited) / 信州大学繊維学部 G-COE 国際特別講演会 / 2010. 11. 22

H. Sakai / Physicochemical importance of the red blood cells structure in the designing of artificial

red cells (Invited) / Seminar at Department of Bioengineering, University of California, San Diego / 2010. 11. 19

H. Sakai / Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers based on bioconjugate chemistry and nanobiotechnology for versatile clinical application / BIT's 1st Annual World Conference of NanoMedicine-2010 / International Convention Center / Beijing, China / 2010. 10. 23-25.

H. Sakai / Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers for versatile clinical application / Applied Chemistry Lecture Series of Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences (CIAC) / Changchun, China / 2010. 10. 21.

酒井 宏水 / ヘモグロビン小胞体の開発の歴史と現状 / 第17回日本血液代替物学会年次大会 / 熊本市国際交流会館 / 2010. 10. 17-18.

H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayahi / Nano dimension hemoglobin lipid vesicles as oxygen carriers for versatile clinical applications / The 2nd World Congress of the International Academy of Nanomedicine / Calista Luxury Resort, Antalya, Turkey / 2010. 10. 3-6.

H. Sakai, H. Horinoichi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / HEMOGLOBIN-VESICLES, ARTIFICIAL RED CELLS, AS O₂ AND CO CARRIERS FOR CYTOPROTECTION / The 5th SBE International Conference on Bioengineering and Nanotechnology / Biopolis, Singapore / 2010. 8. 1-4.

酒井宏水 / 人工赤血球：ヘモグロビン小胞体の新しい臨床応用 / 第9回国際バイオEXPO / 東京ビックサイト / 2010.6.30-7.2

〔図書〕 (計5件)

H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carriers to mimic the red blood cells structure. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). (in press).

H. Sakai. Biocompatibility of a highly concentrated fluid of Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. In: Selective Topics in Nanomedicine (T.M.S. Chang ed.) World Scientific, Singapore (in press)

H.W. Kim, A. Mozzarelli, H. Sakai, J. Jahr.

Academia-industry collaboration in blood substitute development. – issues, case histories and a proposal. In: Chemistry and Biochemistry of Oxygen Therapeutics: from Transfusion to Artificial Blood. (Ed. by S. Bettati and A. Mozzarelli), Chapter 29. pp. 413-428. John Wiley & Sons (2011)

H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Hemoglobin-vesicles as a cellular type hemoglobin-based oxygen carrier. In: Chemistry and Biochemistry of Oxygen Therapeutics: from Transfusion to Artificial Blood. (Ed. by S. Bettati and A. Mozzarelli), Chapter 27, pp.381-390. John Wiley & Sons (2011)

H. Sakai. Artificial oxygen carriers (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics. IFMBE Proceedings 35 (5th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering 2011 (BIOMED 2011) 20-23 June 11, Kuala Lumpur, Malaysia), 845-848 (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：小胞体の製造法

発明者：酒井宏水

権利者：早稲田大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/59233

出願年月日：2012年4月4日

国内外の別：国外・国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/>

報道等

NHK E テレ 「サイエンス ZERO」 人工赤血球の研究を紹介 (2012年7月15日)

J-CAST ニュースに紹介記事。「早大グループが「人工赤血球」を開発 大学見本市で発表」 (2012年10月19日)

日本経済新聞 朝刊に紹介記事。「知の明日を築く、アジア発、生命科学研究」 (2012年12月6日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 宏水 (SAKAI HIROMI)

早稲田大学重点領域研究機構・教授

研究者番号：70318830

(2)連携研究者

小林 紘一 (KOBAYASHI KOICHI)

慶應義塾大学医学部・名誉教授

研究者番号：80051704