

## 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24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20249072

研究課題名（和文） 全合成人工赤血球による循環障害の革新的治療法の研究

研究課題名（英文） Utility of Innovative Artificial Oxygen Carriers for Diseases Derived From Circulatory Derangements

研究代表者

川口 章（KAWAGUCHI AKIRA）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30195052

研究成果の概要（和文）：

わが国では人工酸素運搬体としてリポゾーム封入ヘモグロビン、ヘモサイクロデキストリン、コルフィセンミオグロビンなどが開発されている。本研究では、循環障害に基づく多様で多彩な病態において、これらの人工酸素運搬体の効果を検討した。すなわち、実験動物モデルにおいて有用性を検討し、用量・効果関係などから病態の解明に資するとともに、その作用機序に沿って改善を試み、治療効果の更なる改良を計って、実用化に近づけた。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated newly developed artificial oxygen carriers (AOCs), such as liposome-encapsulated hemoglobin (LEH), hemocyclodextrin, corphysene-myoglobin, in the animal models of various pathologic conditions derived from circulatory disorder. These AOCs, specifically LEH, have been proved to be protective of the organ function and morphologic structure in ischemia and/or reperfusion injury of the brain, cochlea and skeletal muscle. LEH is shown to be effective in accelerating wound healing in the stomach and skin. LEH is also shown to be inert and safe on intravenous infusion in mice reconstituted with human immune system. The mice remains immunologically intact and normally responding against third party antigens after transfused with a large amount of LEH (20 mL/kg), which may competitively inhibit the antigen processing activity of the host.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2009年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2011年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
年度			
総計	37,100,000	11,130,000	48,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：救急蘇生学

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初（2008年）赤血球に代わる人工酸素運搬体として、欧州では主に過酸化フッ素化合物が研究され、米国では修飾ヘモグ

ロビンがすでに臨床治験に入っていた。わが国では、これらと違って、細胞・カプセル型のリポゾーム封入ヘモグロビン（LEH）、全合成のヘモサイクロデキストリン（HemoCD）、イミ

ダゾールサイクロデキストリン (ImCD)、混合型のコルフィセンミオグロビン (CoMb) や一酸化窒素を含有する修飾ヘモグロビンの SNO-PEG-Hb など、独自の人工酸素運搬体が開発されていた。

## 2. 研究の目的

LEH、HemoCD、CoMb および SNO-PEG-Hb など、わが国で開発された人工酸素運搬体を用いた循環障害に基づく多様な疾患への治療的介入を目指す。有効なものに関しては、作用機序を検討して病態の解明に資するとともに、そのメカニズムに沿って人工酸素運搬体を改善・修飾して治療効果の更なる改良を計り、実用化に近づけることを目標とする。

## 3. 研究の方法

LEH (テルモ)、HemoCD (同志社大学)、ImCD (同志社大学)、CoMb (千葉大学) および SNO-PEG-Hb (東北大学) などを大量量産し、循環不全に起因する様々な病態を呈する動物実験モデルにおいて、

- (1) 有効性・有用性の判定を行い、
- (2) 用量効果関係から作用機序の解明、
- (3) 修飾・調整により更なる機能向上に努め、
- (4) 人工酸素運搬体の安全性を検討した。

## 4. 研究成果 (○数字は発表論文に一致)

赤血球に代わる人工酸素運搬体が実用化された場合のシミュレーションを行ったところ⑫⑭ $\alpha$ ) 救急医学での出血性ショックに対する緊急輸血、 $\beta$ ) 輸血部での稀な血液型への対応、 $\gamma$ ) 手術部での輸血対応において大きなインパクトが予想された⑬。2008年には米国で行われていた修飾ヘモグロビンの臨床試験において、心筋梗塞・死亡が有意に増加したことが判明(Natanson 2008)し、試験が全て中止された。また赤血球でも献血後2週間以上経過すると比較的新鮮な赤血球(<2W)に比べて死亡率が有意に増加することが報告された。これらのことから、当面は人工酸素運搬体を大量に使用する赤血球代替物としての用途には限界があると考えられ、人工臓器として輸血代替物以外の有用性を検討した⑫⑭。

臓器循環障害の典型として、脳梗塞があげられる。ラット中大脳動脈に糸を挿入する糸塞栓モデルで脳浮腫軽減効果⑮が明らかとなった。ラット中大脳動脈を光凝固する虚血再還流障害モデルにおいても、LEHの効果が見られた⑯。これらの効果のメカニズムとして、 $^{18}\text{F}$ でラベルした $^{18}\text{F}$ -LEHの虚血脳還流パターンを観察したところ、梗塞領域と対照となるイメージとなったので、LEHの血管外漏出ではなくLEHの血管内還流による脳保護効果と推定された⑯。同様の脳虚血再還流障害における保護効果は、サルでの陽電子射出断

層装置 (PET) を用いた実験からも、酸素消費量の維持=脳皮質細胞の保護が明らかとなった⑯。これらの脳虚血モデルでは、皮質は有意に保護されたが、還流域の基底核はほとんど保護効果は見られなかった。

循環障害に由来する脳虚血以外の病態として、消化管手術後の創傷治癒促進⑩、突発性難聴の原因とされる内耳虚血①、骨格筋虚血再還流②、皮膚欠損後の創傷治癒③などにおいて、LEHの臓器組織(形態)および臓器機能保護効果(機能)が確認された。

癌治療においては、癌組織の低酸素状態が放射線治療への感受性を低下させていると推測されている。マウスの担癌モデルにおいて LEH と放射線を併用した場合、それぞれを単独で投与した場合よりも有意に腫瘍縮小効果が増強された④⑨。これにより、LEH が癌組織を還流して酸素分圧を上昇させ、放射線への感受性を向上させたと推測された。癌治療にあたっては、放射線以外の化学療法との併用効果を検討している。

大量生産が可能で製剤として先行していた LEH⑫~⑰⑱について検討してきた。実用化は LEH が最も近いことから、LEH そのものの安全性についても検討した。すなわち、ヒトに投与した際の免疫応答は従来臨床試験でしか判断できなかったが、ヒト臍帯血によってヒト免疫環境を構築した NOG マウスを用いて検討したところ、LEH 投与は特段の免疫反応をきたさなかった⑰。赤血球代替物として投与する際には、出血性ショックでは病原微生物や外科手術ではがん抗原などが混在することが予想される。また大量投与した LEH が細網内皮系で代謝される際にその抗原提示能を競合的に阻害する可能性がある。この点を遺伝子操作マウスで検討した。LEH の大量投与後の血中での共存は、第3抗原に対するホストの抗原提示能および初期の免疫応答を抑制することはなかった⑦。

大量生産が可能で製剤として先行している LEH⑫~⑰⑱について検討してきたが、全合成の HemoCD⑱⑳および ImCD、一酸化窒素を供与する修飾ヘモグロビン SNO-PEG-Hb⑲、修飾ミオグロビン⑥㉑などについての検討も併せて進めてきた。これらの人工酸素運搬体の有用性・問題点や将来像についてまとめ、今後の研究方向を示した⑦。

## 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 21 件)

- ① Okada M, Kawaguchi AT, Hakuba N, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after Transient cochlear ischemia and reperfusion in the gerbil. *Artif Organs* 2012;36:178-184 査読有
- ② Kurita D, Kawaguchi AT, et al.

- Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates energy metabolism in skeletal muscle ischemia and reperfusion in the rat. *Artif Organs* 2012;36:185-193 査読有
- ③ Fukui T, Kawaguchi AT, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin accelerates skin wound healing in mice. *Artif Organs* 2012;36: 161-169 査読有
- ④ Murayama C, Kawaguchi AT, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates tumor hypoxia and enhances radiation therapy to suppress tumor growth in mice. *Artif Organs* 2012;36: 170-177 査読有
- ⑤ Kawaguchi AT, et al. Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on antigen-presenting cells in mice. *Artif Organs* 2012;36: 194-201 査読有
- ⑥ Neya S, Kawaguchi AT. Inherently distorted heme as a novel tool for myoglobin-based oxygen carrier. *Artif Organs* 2012;36: 220-3 査読有
- ⑦ Kawaguchi AT. Artificial oxygen carriers - clinical point of view. *Artif Organs* 2012;36: 127-129 査読有
- ⑧ Kitagishi T, Negi S, Kiriya A, Honbo A, Sugiura Y, Kawaguchi AT, Kano K. A diatomic molecular receptor that removes CO in a living organism. *Angew Chem Int Ed* 2010;49:1312-5 査読有
- ⑨ Kawaguchi AT, Haida M, Yamano M, Ogata Y, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates ischemic stroke in nonhuman primates. An acute study. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 429-436 査読有
- ⑩ Okamoto Y, Kawaguchi AT, Kise Y, Makuuchi H, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin accelerates gastric wound healing in the rat. *Tokai J Exp Clin Med* 2009;99:105 査読有
- ⑪ Murayama C, Kawaguchi AT, Tsukada H, et al. Evaluation of D-18F-FMT, 18F-FDG, L11C-MET, and 18F-FLT for monitoring the response of tumors to radiation therapy in mice. *J Nucl Med* 2009;50:290-295 査読有
- ⑫ Kawaguchi AT. Artificial oxygen carriers: A clinical point of view. *Artif Organs* 2009;33:97-99 査読有
- ⑬ Yoshida F, Kawaguchi AT, et al. Possible role of artificial oxygen carriers in transfusion medicine: A retrospective analysis on the current transfusion practice. *Artif Organs* 2009;33: 127-132、査読有
- ⑭ Kawaguchi AT, Haida M, Yamano M, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) alleviates brain edema after permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Artif Organs* 2009;33: 153-158 査読有 153-158
- ⑮ Fukumoto D, Kawaguchi AT, Haida M, Tsukada H, et al. LEH reduces the size of cerebral infarction in rats: Effect of oxygen affinity. *Artif Organs* 2009;33: 159-163 査読有 159-163
- ⑯ Urakami T, Kawaguchi AT, Tsukada H, Oku N. In vivo Distribution of LEH determined by positron emission Tomography. *Artif Organs* 2009;33: 164-168 査読有
- ⑰ Kawaguchi AT, Kametani Y, et al. Effects of LEH on Human Immune System: Evaluation in Immuno-deficient Mice Reconstituted With Human Cord Blood Stem Cells. *Artif Organs* 2009;33: 169-176 査読有
- ⑱ Kano K, Kitagishi H, et al. HemoCD as an artificial oxygen carrier: Oxygen binding and autooxidation, *Artif Organs* 2009;33: 177-182 査読有
- ⑲ Kawaguchi AT, Nakai K, Yamano M, Tsukada H, et al. S-Nitrosylated Pegylated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in Rats. *Artif Organs* 2009;33: 183-188 査読有
- ⑳ Neya S and Suzuki M. Novel controlling mechanism of the oxygen affinity in myoglobin with isomeric porphyrins. *Artif Organs* 2009;33: 189-193 査読有
- ㉑ 川口 章、人工酸素運搬体、呼吸と循環、査読有、56 巻、2008、1275-1280 査読有
- [学会発表] (計 28 件)
1. Kawaguchi AT. Liposome-encapsulated hemoglobin, artificial O<sub>2</sub> carrier preserves VO<sub>2</sub> and protects myocardium after myocardial ischemia/reperfusion in the rat. American Heart Association November 14, 2012, Orlando, Convention Center
  2. 川口 章. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates ischemic stroke in nonhuman primates -Longitudinal observation- 日本血液代替物学会 2011 年 10 月 28 日、北海道大学医学部学友会館 (北海道)
  3. 川口 章. Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on Antigen-Presenting cells in mice. 日本血液代替物学会 2011 年 10 月 28 日、北海道大学医学部学友会館 (北海道)

4. 川口 章、Liposome-encapsulated hemoglobin improves energy metabolism in skeletal muscle ischemia and reperfusion in the rat. 日本血液代替物学会 2011 年 10 月 28 日、北海道大学医学部学友会館 (北海道)
5. 川口 章、Liposome-encapsulated hemoglobin accelerates gastric wound healing in the rat. 日本血液代替物学会 2011 年 10 月 28 日、北海道大学医学部学友会館 (北海道)
6. 川口 章、ミオグロビンによる人工酸素運搬体創成にむけた非平面性ヘムの導入、日本血液代替物学会 2011 年 10 月 28 日、北海道大学医学部学友会館(北海道)
7. 村山 千恵子、川口 章、リボソーム封入ヘモグロビンによる癌の放射線治療および化学療法に対する増強効果、日本血液代替物学会 2011 年 10 月 28 日、北海道大学医学部学友会館 (北海道)
8. Yamagiwa T, Kawaguchi AT. Imidazole cyclodextrin (ImCD), totally synthetic supramolecular complex as an antidote for cyanide poisoning. ESAO&IFAO October9,2011, Porto Congress Centre (Porto, Portugal)
9. Kawaguchi AT. Effect of liposome-encapsulated hemoglobin after transient cochlear ischemia and reperfusion in the gerbil. ESAO&IFAO October11,2011 Porto Congress Centre (Porto, Portugal)
10. Kawaguchi AT. Liposome-encapsulated hemoglobin reduced cerebral infarct volume in rodent transient focal ischemia. ESAO&IFAO October11,2011 Porto Congress Centre (Porto, Portugal)
11. Kawaguchi AT. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates skeletal muscular ischemia and reperfusion injury in the rat. ESAO&IFAO October11,2011 Porto Congress Centre (Porto, Portugal)
12. Kawaguchi AT. Liposome-encapsulated hemoglobin accelerates skin wound healing in mice. ESAO&IFAO October11,2011 Porto Congress Centre (Porto, Portugal)
13. Takeichi H, Kawaguchi AT. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates bronchial anastomotic healing after radiation and pneumonectomy in the rat. ESAO&IFAO October11,2011 Porto Congress Centre (Porto, Portugal)
14. Murayama C, Kawaguchi AT. Liposome-encapsulated hemoglobin enhances chemotherapy to suppress tumor growth and metastasis in mice. ESAO&IFAO October11,2011 Porto Congress Centre (Porto, Portugal)
15. 山際 武志、川口 章、他、急性シアン化合物中毒に対する新たな全合成解毒剤”イミダゾールシクロデキストリン”の *in vitro*における効果、第 39 回日本救急医学会総会、2011 年 10 月 18 日、京王プラザホテル(東京)
16. Yamagiwa T, Kawaguchi AT. Imidazole Cyclodextrin (ImCD) as an antidote for Cyanide Poisoning: *In Vitro* and *In Vivo* Results. The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) September30, 2011, Marriott Marquis Hotel (San Francisco, USA)
17. Murayama C, Kawaguchi AT. Liposome-encapsulated hemoglobin enhances radiotherapy and chemotherapy to suppress tumor growth and metastasis in mice. European Multidisciplinary Cancer Congress September28, 2011, Université Catholique de Louvain(Stockholm, Sweden)
18. 山際 武志、川口 章、他、*In vitro*におけるシアン化合物に対する解毒剤の評価方法の確立、第 33 回日本中毒学会総会、2011 年 7 月 30 日ソフトピアジャパン (岐阜)
19. Kawaguchi AT. Liposome-encapsulated hemoglobin reduced cerebral infarct volume in rodent transient focal ischemia. ASAIO June, 2011 Hilton Honors (Washington DC, USA)
20. Okada M, Kawaguchi AT, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia and reperfusion. ASAIO May27, 2010 Baltimore (Mary land, USA)
21. Kawaguchi AT. Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on antigen-presenting activity. ASAIO May27, 2010 Baltimore (Mary land, USA)
22. Kawaguchi AT. Miniature Cardiopulmonary Bypass System for Mice. ASAIO May27, 2010 Baltimore (Mary land, USA)
23. Kawaguchi AT, Aokawa J, Kametani Y. Effect of liposome-encapsulated hemoglobin (TRM-645) in a large dose- An experimental evaluation in mice. ASAIO J 55:162. May28, 2009 Dallas, TX
24. Fukui T, Kawaguchi AT, Andou N, Fuzinuma C, Kaneda S, Tanaka R. Liposome-encapsulated hemoglobin accelerates skin wound healing in diabetic dB/dBmice. ASAIO J 55:162. May28, 2009 Dallas, TX
25. Kitagishi H, Kano K, Sugiura Y, Negi S, Iga K, Kuriyama A, Honbo A, Kawaguchi AT. HemoCD as an artificial oxygen carrier: Pharmaceutical study in vivo. ASAIO J 55:166. May29, 2009 Dallas, TX

26. Kawaguchi AT, Hashimoto N, Kawaguchi Y, Kato S, Sato K. Miniature cardiopulmonary bypass system for mice. *ASAIO J* 55:133. May29, 2009 Dallas, TX
27. Kawaguchi AT, Haida M, Oku N, Tsukada H, et al. Flow patterns of liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) in cerebral ischemia as shown by <sup>18</sup>F-labeled LEH on PET in the rat. *ASAIO J* 54:3A. June20, 2008 SF, CA
28. Kawaguchi AT, Fukumoto D, Haida M, Ogata Y, Tsukada H. An artificial O<sub>2</sub> carrier, liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) as a plasma oxygenizer. *ASAIO J* 54:3A June20, 2008 SF, CA

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称：循環補助薬

発明者：川口章、森本克己、金田伸一

権利者：テルモ株式会社

種類：特許権

番号：特願 2011-201940

出願年月日：2011 年 9 月 15 日

国内外の別：国内

名称：シアン解毒剤

発明者：川口章

権利者：東海大学

種類：特許権

番号：特願 2010-157599

出願年月日：2010 年 7 月 12 日

国内外の別：国内・国外

名称：一酸化炭素除去剤

発明者：加納航治、川口章ほか

権利者：同志社大学、東海大学

種類：特許権

番号：特願 2009-43632

出願年月日：2009 年 2 月 26 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：心臓装着用弾性ネット

発明者：川口章、岸田晶夫、山岡哲二

権利者：東海大学、東京医科歯科大学、

国立循環器病センター

種類：特許権

番号：4 2 6 1 4 2 2

取得年月日：2009 年 2 月 20 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 章 (KAWAGUCHI AKIRA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30195052

### (2) 研究分担者

加納 航治 (KANO KOJI)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：60038031

(H22→H23：連携研究者)

根矢 三郎 (NEYA SABURO)

千葉大学・薬学部・教授

研究者番号：10156169

山野 眞利子 (YAMANO MARIKO)

大阪府立大学・

総合リハビリテーション学部・准教授

研究者番号：80192409

奥 直人 (OKU NAOTO)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10167322

(H20→H22)

黒田 泰弘 (KURODA YASUHIRO)

東海大学・糖鎖科学研究所・特定研究員

研究者番号：40398756

(H20)

今井 清博 (IMAI KIYOHIRO)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：50028528

(H23)

白井 幹康 (SHIRAI MIKIYASU)

国立循環器病研究センター・

心臓生理機能部・部長

研究者番号：70162758

(H23)

### (3) 連携研究者

猪口 貞樹 (INOKUCHI SADAHI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60160008

灰田 宗孝 (HAIDA MUNETAKA)

東海大学医療技術短期大学・

看護学部・教授

研究者番号：20208408