

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/151243

発行日 令和1年12月12日 (2019.12.12)

(43) 国際公開日 平成30年8月23日 (2018.8.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	4 C 0 7 6
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/18 (2015.01)	A 6 1 K 35/18	
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

出願番号 特願2018-568621 (P2018-568621)	(71) 出願人 504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/005391	
(22) 国際出願日 平成30年2月16日 (2018.2.16)	
(31) 優先権主張番号 特願2017-28738 (P2017-28738)	(74) 代理人 100088904 弁理士 庄司 隆
(32) 優先日 平成29年2月20日 (2017.2.20)	(74) 代理人 100124453 弁理士 資延 由利子
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(74) 代理人 100135208 弁理士 大杉 卓也
	(72) 発明者 西堀 正洋 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内
	(72) 発明者 和氣 秀徳 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

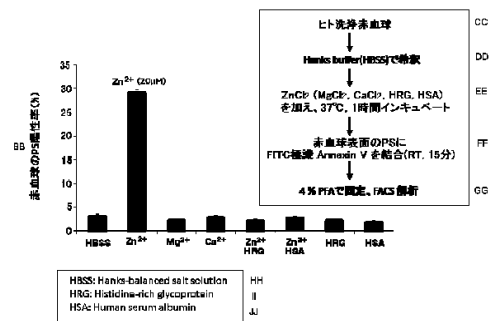
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 赤血球保護剤

(57) 【要約】

赤血球含有溶液、例えば赤血球濃縮液をより長期間保存でき、より安全に使用するための赤血球保護剤を提供する。赤血球を長期保存すると赤血球膜表面にホスファチジルセリン (Phosphatidylserine: PS) が発現する。本発明のヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG) を有効成分として含有する赤血球保護剤によれば、HRGが赤血球表面のPS発現を抑制し、赤血球含有溶液を長期間保存でき、より安全に使用することができる。

HRG は亜鉛イオンによる赤血球膜上PS発現を抑制した AA



AA HRG suppressed PS expression by zinc ion on red blood membrane  
 BE PS positive ratio (%) of red blood cells  
 CC Human washed red blood cell  
 DD Dilute with Hanks buffer (HBSS)  
 EE Add ZnCl<sub>2</sub> (MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, HRG, HSA) and incubate at 37°C for one hour  
 FF Bind FITC-labelled Annexin V to PS on red blood cell surface (RT, 15 minutes)  
 GG Fix with 4% PFA and analyze by FACS  
 HH HBSS: Hanks-balanced salt solution  
 II HRG: Histidine-rich glycoprotein  
 JJ HSA: Human serum albumin

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒスチジンリッチ糖タンパク質を有効成分として含有する、赤血球保護剤。

## 【請求項 2】

赤血球の保護が、ヒスチジンリッチ糖タンパク質により赤血球膜表面のホスファチジルセリンの発現を抑制することによる、請求項 1 に記載の赤血球保護剤。

## 【請求項 3】

赤血球の保護が、赤血球細胞内のカルシウムイオン濃度を低下することによる、請求項 1 に記載の赤血球保護剤。

## 【請求項 4】

赤血球の保護が、赤血球細胞内の抗酸化酵素の遊離を抑制することによる、請求項 1 に記載の赤血球保護剤。

## 【請求項 5】

ヒスチジンリッチ糖タンパク質を有効成分として含有する、赤血球含有溶液の安定化剤。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の赤血球保護剤を含む、赤血球含有溶液の安定化剤。

## 【請求項 7】

請求項 5 又は 6 に記載の安定化剤を赤血球含有溶液に添加することを特徴とする、赤血球含有溶液の安定化方法。

## 【請求項 8】

ヒスチジンリッチ糖タンパク質を有効成分として含有する、赤血球膜表面のホスファチジルセリン発現抑制剤。

## 【請求項 9】

ヒスチジンリッチ糖タンパク質を赤血球含有溶液に添加することを特徴とする、赤血球膜表面のホスファチジルセリン発現抑制方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、赤血球保護剤に関する。より詳しくはヒスチジンリッチ糖タンパク質を含む赤血球保護剤に関する。

## 【0002】

本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願 2017-28738 号優先権を請求する。

## 【背景技術】

## 【0003】

輸血用血液製剤には赤血球製剤、血漿製剤、血小板製剤及び全血製剤等がある。赤血球製剤は、血液から血漿、白血球及び血小板の大部分を除去したものである。赤血球 (Red blood cell : RBC) は、長期間保存すると赤血球膜が破壊され、ヘモグロビンが遊離する、いわゆる溶血が生じる。血球濃厚液の保存には、酸-クエン酸ナトリウム-デキストロース (Acid-citrate-dextrose) を含む ACD 液やクエン酸ナトリウム-リン酸ナトリウム-デキストロース (Citrate-phosphate-dextrose) を含む CPD 液が古くより用いられてきた。さらに脱アミノ反応によって損失したアデニンを補うために、近年では保存液にアデニンが添加されている。保存温度は 2 ~ 3 で有効期間は採血後 3 週間であり、条件により 6 週間まで延長することができるといわれている。しかしながら赤血球の冷蔵保存を継続すると、グルコースの消費が低下し、代謝廃棄物 (すなわち、乳酸及び水素イオン) が増加することが確認された。このようなグルコースの代謝低下により、アデノシン三リン酸 (ATP) が枯渇し、赤血球の劣化が生じる。全血から赤血球を分離した後に、赤血球を保存するための開発が進められている。例えば、Adsol (商標名) (AS-1)、Nutricel (商標名) (AS-3)、Optosol (商標名) (AS-5) 及び Erythro-sol (商標名) 等が挙げられる。これらの AS (AS-1、AS-2 及び AS-3) は、食塩水、アデニン、グルコース、並びに「細胞膜の保護

10

20

30

40

50

剤」としての少量のクエン酸及び/又はマンニトールを含むものである。アデニンとデキストロースと、少なくとも1つの非代謝性の膜保護糖と、pH緩衝系とを含む赤血球の保存のための組成物及び方法について開示がある（特許文献1）。

【0004】

ヒスチジンリッチ糖タンパク質（Histidine-rich glycoprotein; HRG）は、1972年にHeimbürger et al (1972)によって同定された分子量約80kDaの血漿タンパク質である。合計507個のアミノ酸より構成され、そのうちヒスチジンが66存在する高ヒスチジン含有タンパク質であり、主として肝臓で合成され、約100~150 µg/mLという非常に高いと考えられる濃度でヒト血漿中に存在する。HRGは、凝固線溶系の調節や血管新生の制御に参与していることが知られている（非特許文献1）。さらに、HRGポリペプチドを投与することによる血管形成を阻害する方法、HRGポリペプチド、HRGポリペプチドに結合する抗体及び受容体、HRG欠乏性血漿及びポリヌクレオチド、HRGポリペプチドをコードするベクター及び宿主細胞を含む、製薬的組成物及び製品が開示されている（特許文献2）。また、血管新生の分野に関し、HRGの中央領域に由来するサブフラグメントを含む抗血管新生活活性のある実質的に純粋な連続ポリペプチドの使用に関する開示がある（特許文献3）。さらに、HRGを有効成分とする好中球 血管内皮細胞接着抑制剤についても開示がある（特許文献4）。

10

【0005】

しかしながら、HRGによる赤血球の安全性、安定性に及ぼす効果については、報告されていない。赤血球を保護するさらなる方法の開発が望まれている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Blood, Vol.117, No.7, 2093-2101 (2011)

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特表2008-529550号公報

【特許文献2】特表2004-527242号公報

【特許文献3】特表2007-528710号公報

【特許文献4】特許第5807937号公報

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、赤血球含有溶液、例えば赤血球濃縮液をより長期間保存でき、より安全に使用するための赤血球保護剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本願発明者らは、赤血球を長期保存すると赤血球膜表面にホスファチジルセリン（Phosphatidylserine; PS）が発現すること、このPSの発現より赤血球の血管内皮細胞とコラーゲン繊維とが接着することに着目し、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、HRGが細胞表面のPS発現を抑制しうることを初めて見出し、本発明を完成した。

40

【0010】

すなわち本発明は、以下よりなる。

1. HRGを有効成分として含有する、赤血球保護剤。
2. 赤血球の保護が、HRGにより赤血球膜表面のホスファチジルセリンの発現を抑制することによる、前項1に記載の赤血球保護剤。
3. 赤血球の保護が、赤血球細胞内のカルシウムイオン濃度を低下することによる、前項1に記載の赤血球保護剤。
4. 赤血球の保護が、赤血球細胞内の抗酸化酵素の遊離を抑制することによる、前項1に記載の赤血球保護剤。

50

5. HRGを有効成分として含有する、赤血球含有溶液の安定化剤。
6. 前項1～4のいずれかに記載の赤血球保護剤を含む、赤血球含有溶液の安定化剤。
7. 前項5又は6に記載の安定化剤を赤血球含有溶液に添加することを特徴とする、赤血球含有溶液の安定化方法。
8. HRGを有効成分として含有する、赤血球膜表面のホスファチジルセリン発現抑制剤。
9. HRGを赤血球含有溶液に添加することを特徴とする、赤血球膜表面のホスファチジルセリン発現抑制方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明の赤血球保護剤によれば、赤血球保存による赤血球劣化を抑制することができる。有効成分としてのHRGを、既存の血液保存用液や赤血球保存用液、又は今後開発される血液保存用液や赤血球保存用液に添加することで、より効果的に赤血球を保護することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】赤血球溶液試料に各濃度の $Zn^{2+}$ を加えたときのホスファチジルセリン(PS)の発現量の結果を示す図である。 $Zn^{2+}$ 濃度依存的に赤血球膜表面においてPSが発現していることが確認された。(参考例1)

【図2】 $Zn^{2+}$ により発現誘導される赤血球膜表面PSに対する同時に添加されたHRG又はヒト血清アルブミン(HSA)の作用を確認した結果を示す図である。 $Zn^{2+}$ の効果は $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ には認められない。(実施例4)

20

【図3】 $Zn^{2+}$ により発現誘導される赤血球膜表面PSに対する同時に添加されたHRG又はHSAの作用を確認した結果図である。HRGはHSAと比べて、より強力にPS発現を抑制することが観察された結果を示す図である。(実施例5)

【図4】あらかじめ $Zn^{2+}$ により発現誘導された赤血球膜表面PSに対するHRG又はHSAのその後の作用を確認した結果図である。HRGはHSAと比べて、より強力にPS発現を抑制することが観察された結果を示す図である。(実施例6)

【図5】HRGによる無刺激状態の赤血球のコラーゲンIへの接着抑制能を確認した結果図である。HRG濃度依存的に赤血球がコラーゲンIに接着するのが抑制された結果を示す。(実施例7)

30

【図6】 $Zn^{2+}$ で赤血球をあらかじめ刺激し、その後HRGを添加し、血管内皮細胞への接着能を調べた結果図である。HRG濃度依存的に赤血球が血管内皮細胞に接着するのが抑制された結果を示す。(実施例8)

【図7】赤血球保存用液にHSAを加えて4で21日間保存したときの赤血球膜表面のPS陽性率に及ぼす影響を確認した結果を示す図である。(実施例9)

【図8】CLPマウス赤血球膜表面のPS発現確認結果を示す図である。採血直後の赤血球及び4時間37インキュベートした後の赤血球について、赤血球膜表面のPS陽性率とin vivoでのHRG投与による作用を示す図である。(実施例10)

【図9】 $Zn^{2+}$ により発現誘導された赤血球膜表面PSに対するHRGの作用を確認したフローサイトメリーの実験結果を示す図である。(実施例11)

40

【図10】 $Zn^{2+}$ による細胞内カルシウムの上昇とHRGによる抑制を確認した結果を示す図である(図10A)。図10Aは、HRGを添加しないグループでは赤血球細胞内のカルシウム量は上昇したが、HRGを添加したグループで、遊離カルシウム濃度が低下した結果を示す。また、図10Bは、 $Zn^{2+}$ 刺激による赤血球の凝集と血管内皮細胞への凝集した赤血球の接着に及ぼすHRGの抑制効果を示す。(実施例12)

【図11】 $Zn^{2+}$ 刺激又はカルシウムイオノフォアで刺激した赤血球懸濁液試料について、ペルオキシレドキシニン2(Prx2)遊離を確認した結果を示す図である。図11Aは $Zn^{2+}$ 濃度依存的に上清中のPrx2が増加することを示し、図11Bはカルシウムイオノフォアで刺激した赤血球溶液試料について、Prx2が増加することを示す。(参考例2)

【図12】 $Zn^{2+}$ によるPrx2遊離とHRGによる抑制効果を確認した結果を示す図である。(

50

実施例 13)

【図 13】CLP敗血症モデルマウスからCLP作製24時間後に採血し、得られた血漿中のPrx2を確認した結果を示す図である。CLPマウスでは、血漿中Prx2が上昇していることを確認した結果を示す図である。(参考例3)

【図 14】CLP敗血症モデルマウスについて、血中遊離ヘモグロビン、PS陽性赤血球、赤血球細胞内カルシウム濃度、臓器組織内Zn含量を確認した結果を示す図である。図 14 Aは遊離ヘモグロビンのウエスタンブロットとその定量結果を示し、図 14 Bは採血直後と、血液4時間インキュベーション後のPS陽性赤血球の割合を示し、図 14 Cは4時間インキュベーション後の赤血球内遊離カルシウム濃度を示し、図 14 Dは臓器組織のZn含量を示す。(実施例14)

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、赤血球保護剤に関し、より詳しくはヒスチジンリッチ糖タンパク質(HRG)を含む赤血球保護剤に関する。

【0014】

本明細書において「赤血球保護剤」とは、血液中に含まれる赤血球や、血液から分離された赤血球を保存液等に懸濁させた場合等、生体外での赤血球の劣化を防ぐために使用される保護剤をいう。本発明の赤血球保護剤は、薬理的に許容しうる担体を含ませることができる。該薬理的に許容しうる担体としては、例えば、賦形剤、崩壊剤若しくは崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤若しくは溶解補助剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等が挙げられる。

【0015】

本明細書において「血液保存用液」とは、血液を保存するために用いられる溶液であって、例えば輸血用血液製剤に使用される保存用液、具体的には赤血球製剤、血漿製剤、血小板製剤及び全血製剤等に用いられる保存用液をいう。本明細書において、「血液保存用液」は、自体公知の保存用液、又は今後開発されるあらゆる保存用液であってもよい。具体的には、ACD液やCPD液であってもよい。例えば、マニトール、アデニン及びリン酸を含む赤血球保存用添加液(MAP液)であってもよいし、ACD液やCPD液に、MAP液を混合したものであってもよい。MAP液の組成として、例えばD-マンニトール、アデニン、結晶リン酸二水素ナトリウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸、ブドウ糖、塩化ナトリウム等が挙げられる。

【0016】

本明細書において「赤血球保存用液」とは、赤血球を保存するために用いられる溶液であって、例えば輸血用血液製剤に使用される保存用液、具体的には赤血球製剤等に用いられる保存用液をいう。本明細書において、「赤血球保存用液」は、自体公知の保存用液、又は今後開発されるあらゆる保存用液であってもよい。具体的にはACD液、CPD液やMAP液であってもよいし、ACD液やCPD液に、MAP液を混合したものであってもよい。

【0017】

本明細書において「赤血球含有溶液」とは、赤血球が保存可能な溶液に含まれている溶液であればよく、特に限定されない。例えば、前述の血液保存用液に赤血球が含まれているものが挙げられる。赤血球含有溶液の例として、赤血球製剤であるところの赤血球濃厚液が挙げられる。赤血球濃厚液は、CPD液を28 mL混合したヒト血液200 mLから白血球及び血漿の大部分を除去した赤血球層にMAP液を約46 mL混和したもので、CPD液を少量含有する濃赤色の液剤である。後述する実施例では、赤血球溶液試料という場合もある。

【0018】

本明細書において「赤血球含有溶液の安定化剤」とは、例えば赤血球濃厚液等の赤血球含有溶液において、赤血球の劣化を防ぎ、安定にするために使用されるものをいう。本発明の赤血球含有溶液の安定化剤は、例えばMAP液のような赤血球保存用液にHRGを添加して作製することができる。具体的には、赤血球保存用液に対してHRGが10~100 µg/mL、好ましくは50~100 µg/mL、より好ましくは100 µg/mL含むものが好適である。本発明の赤血球

10

20

30

40

50

含有溶液の安定化剤に使用可能な赤血球保存用液としては、MAP液に限定されるものではないことは明らかである。本発明の赤血球含有溶液の安定化剤には、薬理的に許容しうる担体を含ませることができる。該薬理的に許容しうる担体としては、例えば、賦形剤、崩壊剤若しくは崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤若しくは溶解補助剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等が挙げられる。

【0019】

本発明の赤血球保護剤や赤血球含有溶液の安定化剤等の有効成分としての「HRG」は、生体成分から単離・精製する方法、遺伝子組換え技術を用いて調製する方法、あるいは合成により調製することができる。例えば血漿、血清等の血液、脊髄液、リンパ液等の生体成分から精製され/若しくは単離することができる。好適な生体成分は、血漿、血清等の血液成分である。生体成分から単離・精製する方法は、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法を適用することができる。例えば、Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) アガロース樹脂を用いて調製したアフィニティカラムに血漿を通すことによって調製することもできる。

10

【0020】

遺伝子組換え技術を用いてHRGを調製する方法も自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法を適用することができる。例えば、HRGをコードする全長cDNA、又はHRGの活性を有する部分をコードするcDNAを、発現ベクターにクローニングし、調製することもできる。例えば、GenBank Accession No.NM000412で特定されるヌクレオチドの全体または部分から生合成されるタンパク質であっても良い。例えば、成熟HRGのアミノ酸配列(配列番号1)をコードする全長cDNA、又は部分をコードするcDNAを、発現ベクターにクローニングし、調製することもできる。本発明の有効成分としてのHRGは、HRGタンパク質の全体であっても良いし、HRG活性を有する部分タンパク質又はペプチドであっても良い。さらに、糖鎖を含むものであってもよいし糖鎖が付加していなくても良い。

20

【0021】

成熟HRGのアミノ酸配列(配列番号1)

VSPTDCSAVEPEAEKALDLINKRRRDGYLFQLLRIDAHLDRVENTTVYYLVLDVQESDCSVLSRKYWNDCEPPDSRRPSEIVIGQCKVIAIRHSHESQDLRVIDFNCTTSSVSSALANTKDSPVLI DFFEDTERYRKQANKALEKYKEENDDFASFVRDRIERVARVRGEGGTGYFVDFSVRNCPRHHFPRHPNVFGFCRADLFYDVEALDLESPKNLVINCEVFDPQEHENINGVPPH LGHPFHWGGHERSSTTKPPFKPHGSRDHHHPKHPHEHGPPPPPPDERDHSHPPLPQGPPPLLPMSCSSCQHATFGTNGAQRHSHNNSSDLHPHKHHSHEQHPHGHHPHAHHPHEHDTHRQHPHGHHPHGHHPHGHHHPHGHHPHCHDFQDYGPCD PPPHNQGHCCGHGPPPGHLRRRGPGKGRPFHCRQIGSVYRLPPLRKGEVLPLPEANFPSFPLPHHKHPLKPDNQPFQ SVSESCPGKFKSGFPQVSMFFTHTFPK

30

【0022】

成熟HRGは、シグナルペプチドからタンパク質分解酵素によって切断されたのち、シスタチン様領域1,2、His/Pro領域、C末端領域の主要な4つの領域から構成されている。His/Pro領域は、プロリン残基及びヒスチジン残基に非常に富んでおり、例えばヒト型ではペントペプチドGHHPH(配列番号2)が保存されたタンデム反復を約12回含む。別の態様では、配列番号1で特定されるアミノ酸配列の第330位~第389位に示すアミノ酸配列で特定される。

40

【0023】

本発明の赤血球保護剤に用いられるHRGは、赤血球膜表面のホスファチジルセリン(PS)の発現を抑制する作用を有する。赤血球膜表面のPSは、赤血球を長期保存した場合や、エネルギー枯渇条件に置いた場合、あるいはProstaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)、Platelet activating factor(PAF)、レチノイン酸や特定の薬物等による刺激を受けた際に発現するといわれている。また、PSを発現した赤血球と血管内皮細胞の相互作用によって、血管内皮細胞が損傷されることが示唆されている。本発明は、HRGを有効成分として含有する赤血球膜表面のPS発現抑制剤にも及び、HRGを赤血球含有溶液に添加することを特徴とする赤血球の保護方法にも及び。さらに本発明は、HRGを赤血球含有溶液に添加することを特徴

50

とする、赤血球膜表面のPS発現抑制方法にも及ぶ。

【0024】

本発明の赤血球保護剤に用いられるHRGは、さらに細胞内カルシウム濃度の低下作用、細胞内の重要な酵素の遊離を抑制する等の作用を有する。細胞内の重要な酵素として、抗酸化酵素が挙げられ、具体的にはペルオキシダーゼ、さらに具体的にはペルオキシレドキシン (Peroxiredoxin; Prx) が挙げられる。Prxは、強い抗酸化作用を持ち、細胞内において多量に存在することから、細胞の生理機能を維持する上で重要な抗酸化酵素である。

【0025】

本発明は、本発明の「赤血球保護剤」又は「赤血球含有溶液の安定化剤」を赤血球含有溶液に添加することを特徴とする赤血球の安定化方法にも及ぶ。即ち、HRGを有効成分とする赤血球保護剤又はHRGを有効成分とする赤血球含有溶液の安定化剤を用いた安定化方法にも及ぶ。赤血球保護剤を赤血球含有溶液に添加することで、例えば赤血球膜表面にPSが発現するのを抑制することができ、又は発現したPSも抑制することができる。PSは、リン脂質の成分であり、通常はフリッパーゼと呼ばれる酵素によって細胞膜の内葉（細胞質側）に留められている。細胞にアポトーシスが起こるとき、PSは細胞の表面に露出するようになる。赤血球では、網状赤血球から核が切り離されると、核はPSを細胞表面上に露出するといわれている。PSは、アポトーシス細胞表面に発現される脂質で、死細胞でのみ細胞膜上に露出されることが知られている。赤血球においても、アポトーシスにおけるDNAの分解と赤血球の核の崩壊の過程で、PSが細胞表面に露出すると考えられることから、赤血球の崩壊の過程でも赤血球表面にPSが露出することが考えられた。そこで、赤血球表面へのPSの露出に及ぼすHRGの作用を確認し、HRGが赤血球表面へのPSの露出を抑制することより、HRGを含む赤血球保存用液は、赤血球含有溶液に含まれる赤血球の保護剤として使用可能である。

【実施例】

【0026】

以下、参考例及び実施例を挙げて本発明をより具体的に説明する。本発明はもとより下記実施例等により制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適当に変更を加えて実施することも可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に含まれる。

【0027】

(実施例1) ヒト血漿由来ヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG) の精製

本実施例では、ヒト血漿由来HRGの精製を行った。ヒト血漿 (240 mL) を出発原料とし、Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィ及び高性能液体クロマトグラフィ (陰イオン交換カラム (単分散系親水性ポリマービーズ: Mono Q)) を用いて、HRGタンパク質を精製した。分子量約80kDa画分にHRG精製試料を得た。

【0028】

(実施例2) 遺伝子組換えヒトHRGの産生

遺伝子組換えヒトHRGは、10% FCS含有GIBCO<sup>(R)</sup> Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) で培養を行ったCHO細胞 (Chinese Hamster Ovary cells) にFuGENE (商標) -HD (遺伝子導入試薬) を用いて、HRG発現ベクター、トランスポゼース発現ベクター、薬剤耐性遺伝子発現ベクターをDNA量 5 : 4 : 1でコトランスフェクトした。遺伝子導入し、48時間培養後から、Puromycin (抗生物質) 10 µg/mLを添加して、3日に1回培地交換を行いながら3週間薬剤選択培養を行った。

【0029】

組換えヒトHRGを含む培養上清を回収した。PBS(-) 30 mLで予め洗浄したQIAGEN<sup>(R)</sup> Ni-NTAアガロースゲル (Sephacrose CL-6B支持体にNi-NTAを結合したゲル) を前記培養上清に加え、4 で2時間回転インキュベートし、組換えヒトHRGをQIAGEN<sup>(R)</sup> Ni-NTAアガロースゲルに結合させた。QIAGEN<sup>(R)</sup> Ni-NTAアガロースゲルを精製用カラムに移した後、洗浄液 1 (30 mM Imidazoleを含むPBS(-) (pH7.4))、洗浄液 2 (1M NaCl +10 mM PB (pH7.4))、洗浄液 3 (PBS(-) (pH7.4)) で順次カラムを洗浄した。組換えヒトHRG は、500 mM Imi

10

20

30

40

50

dazoleを含むPBS(-) (pH7.4)で、4 で溶出を行なった。精製品は、ウエスタンブロットとSDS-PAGE 後のタンパク染色でHRGを確認した。本実施例で作製するHRGは、国際出願番号PCT/JP2016/79219の実施例12に示す方法で作製した。

【0030】

(実施例3) 赤血球濃厚液の保護剤

50 mLあたりD-マンニトール(728.5mg)、アデニン(7.0mg)、リン酸二水素ナトリウム(47.0mg)、クエン酸ナトリウム水和物(75.0mg)、クエン酸水和物(10.0mg)、ブドウ糖(360.5mg)及び塩化ナトリウム(248.5mg)を含む市販の赤血球保存液MAP液(MAP液バッグ)に、ヒト血漿から作製したHRG及びヒト血清アルブミン(HSA)を各々最終濃度が100 µg/mLとなるように加えたものを赤血球含有溶液の保護剤とした。

10

【0031】

(参考例1)  $Zn^{2+}$ による赤血球膜表面のホスファチジルセリン(PS)発現誘導

本参考例では、赤血球濃厚液に対する $Zn^{2+}$ の影響を確認した。

【0032】

10%のACD液を抗凝固剤として含む試験管に10 mLずつ採血し、3000 rpmで10分間遠心処理を行い、血漿及びパフィーコートを除去して赤血球濃厚液を調製し、赤血球溶液試料とした。

【0033】

上記作製した赤血球溶液試料について $Zn^{2+}$ を加えたときの赤血球表面のPSの発現率を測定した。 $Zn^{2+}$ が0、5、10、15及び20 µMとなるように加えて37 で1時間インキュベートした後、赤血球表面のPS発現量を測定した。PS発現量は、赤血球溶液試料400 µLにFITC標識アネキシンV反応液(Funakoshi製)4 µLを加え、室温で15分間静置したのち4%パラホルムアルデヒド(PFA)を400 µL加え、固定後、FACS解析した。これらの操作は、FITC標識アネキシンVアッセイキット(Funakoshi製)の使用説明書に従った。

20

【0034】

上記の結果、添加した亜鉛濃度依存的に、赤血球表面のPS発現割合が上昇することが確認された(図1)。

【0035】

(実施例4) 金属イオンにより発現誘導された赤血球上PSに対するHRGの作用

参考例1と同手法で調製した赤血球溶液試料に、HBSS(Hank's Balanced Salt Solutions)のみ、あるいはHBSSに $ZnCl_2$ (20 µM)、 $MgCl_2$ (20 µM)、 $CaCl_2$ (20 µM)、 $ZnCl_2$ (20 µM) + HRG(100 µg/mL)、 $ZnCl_2$ (20 µM) + HSA(100 µg/mL)、HRG単独(100 µg/mL)又はHSA単独(100 µg/mL)を含む系で37 で1時間インキュベートした後、赤血球表面のPS発現量を測定した。PS発現量は、参考例1と同手法により測定した。

30

【0036】

上記の結果、 $Zn^{2+}$ の添加により、赤血球表面にPSが発現したが、HRGの添加又はHSAを含む系によりPSの発現抑制が観察された(図2)。

【0037】

(実施例5)  $Zn^{2+}$ により発現誘導された赤血球表面のPSに対する作用

本実施例では、HSA又はHRGについて、 $Zn^{2+}$ により赤血球表面に発現誘導されるPSに対する作用を確認した。参考例1と同手法で調製した赤血球溶液試料に、PBS +  $ZnCl_2$ (20 µM)、HSA(1、10、100 µg/mL) +  $ZnCl_2$ (20 µM)、HSA(100 µg/mL) + 生理食塩液、HRG(1、10、100 µg/mL) +  $ZnCl_2$ (20 µM)、HRG(100 µg/mL) + 生理食塩液を加えた系で37 で1時間インキュベートした後、赤血球表面のPS発現量を測定した。PS発現量は、参考例1と同手法により測定した。

40

【0038】

上記の結果、 $ZnCl_2$ (20 µM)を含むグループで、HRGは1 µg/mLでPSの発現抑制が観察されたのに対し、HSAでは1 µg/mLでPSの発現抑制認められなかった(図3)。これにより、HRGはHSAと比べて、より強力にPS発現を抑制することが観察された。

【0039】

50



(実施例6)  $Zn^{2+}$ によりあらかじめ発現誘導された赤血球上PSに対する作用

本実施例では、HSA又はHRGについて、 $Zn^{2+}$ によりあらかじめ赤血球表面に発現誘導されたPSに対する作用を比較検討した。参考例1と同手法で調製した赤血球溶液試料に、 $ZnCl_2$  (20  $\mu$ M)を加えて37℃で1時間インキュベートした。 $ZnCl_2$  (20  $\mu$ M)で処理した赤血球をRBC(Z)とした。コントロールとして、 $ZnCl_2$  (20  $\mu$ M)の代わりにPBSを加えて37℃で1時間インキュベートした(RBC(s))。

【0040】

RBC(Z)について、各濃度のHRG又はHSAを添加し、37℃で15分間インキュベートした。赤血球表面のPS発現量を参考例1と同手法により測定した。

【0041】

上記の結果、RBC(Z)について、HRGは100  $\mu$ g/mLでPSの発現抑制が観察されたのに対し、HSAでは100  $\mu$ g/mLでも十分なPSの発現抑制認められなかった(図4)。これにより、HRGはHSAと比べて、より強力にPS発現を抑制することが観察された。

【0042】

(実施例7) HRGによる赤血球のコラーゲンIへの接着抑制

本実施例では、赤血球のコラーゲンIへの接着に及ぼすHRGの作用を確認した。本実施例では、参考例1と同手法で調製した赤血球溶液試料を用いて検討した。

【0043】

コラーゲンIをコートした市販の細胞培養用プレート(Corning Biocoat Collagen I Cellware)に、上記HRG(1、10、100  $\mu$ g/mL)を含むPBSで保存した赤血球溶液試料(赤血球数: $4 \times 10^6$ /mL)を播種し、37℃で30分間培養した。HRGを含まないPBSのみで保存した赤血球を播種したものをコントロールとした(PBS)。その結果、HRG濃度依存的に赤血球がコラーゲンIに接着するのが抑制されることが観察された(図5)。

【0044】

(実施例8) HRGによる赤血球のコラーゲンIへの接着抑制

本実施例でも、コラーゲンIをコートした市販の細胞培養用プレート(Corning Biocoat Collagen I Cellware)に、実施例6又は7と同手法にてあらかじめ亜鉛刺激した赤血球溶液試料(赤血球数: $4 \times 10^6$ /mL)をHRG(1、10、100  $\mu$ g/mL)依存下に播種し、37℃で30分間培養した。その後実施例7と同手法にてプレートに接着した赤血球数を計測した。本実施例では、実施例6と同手法によりPBSで処理した赤血球をRBC(s)とし、各濃度の $ZnCl_2$ を含むPBSで処理した赤血球をRBC(Z)とした。その結果、 $ZnCl_2$ を含むグループでもHRG濃度依存的に赤血球がコラーゲンIに接着するのが抑制された(図6)。その結果、HRGを含むグループで赤血球を保存した場合に、 $Zn^{2+}$ の存在、非存在に関わらず、コラーゲンIへの接着を抑制することが確認された(図6)。

【0045】

(実施例9) 赤血球保存用液の赤血球保護作用の確認

本実施例では、赤血球溶液試料に対するHRGの赤血球保護作用を確認した。MAP赤血球保存液に最終濃度が100  $\mu$ g/mLとなるようにHRG又はHSAを加え、以下に示す方法で調製した赤血球溶液試料(赤血球数: $8 \times 10^9$ /mL)を加え、4℃で21日間保存した。保存7日目、14日目及び21日目に赤血球溶液試料を採取し、PS陽性の赤血球の割合をFACSで算出した。その結果、保存日数に応じてPS陽性の赤血球の割合が漸増しているが、HRG添加のグループでPS陽性率が抑制されていることが確認された(図7)。

【0046】

本実施例で使用する赤血球溶液試料は以下の方法で調製した。ここで、赤血球溶液試料調製のために、採血バッグとMAP液入りバッグ及びこれらを連結してなるチューブを備えた赤血球濃厚液保存用バッグ(テルモ株式会社)を用いた。

(1) 赤血球濃厚液保存用バッグ(50 mL)に、MAP液バッグより取り出したMAP液を2.7 mL加えた。上記赤血球濃厚液保存用バッグにフィルター滅菌後のHRGを500  $\mu$ L添加し、HRGとHSAの最終濃度が各々100  $\mu$ g/mLとなるように混和し、赤血球保存用液を調製した。

(2) 8.8 mLのACD液を含む試験管に1人あたり80 mLずつ採血し、3000 rpmで10分間遠心

10

20

30

40

50

処理を行い、血漿及びパフィーコートを除去し、赤血球濃厚液を調製した。

(3)(2)で調製した濃厚赤血球液6.8 mLを(1)で調製した赤血球保存用液を含むバッグに加え、先端のチューブをクリップでとめて密閉した。バッグを4 の条件でゆっくり転倒混和し、赤血球濃厚液を含むバッグのチューブのあるほうを上にして保存した。

(4)一定時間後に赤血球保存用液バッグから赤血球サンプルを取り出す時には、バッグを転倒混和し、チューブ部分を一部切り取り、サンプルを採取した。経時的なサンプル採取のため、チューブの先端はその都度密閉した。

#### 【0047】

(実施例10)敗血症モデルマウスの赤血球表面のPS発現確認

本実施例では、盲腸結紮腹膜炎(cecal ligation and puncture; CLP)敗血症モデルマウス(以下、「CLPマウス」ともいう。)から採取した赤血球に及ぼすHRGの影響を確認した。

#### 【0048】

CLP術後10分目にHRG(10mg/kg)、HSA(10mg/kg)及びコントロールとしてのPBS(100 µL)を静注投与した。術後24時間目にマウスを麻酔し、10%のACD液を抗凝固剤として心臓から200 µL採血した。採血した血液を400gで遠心し、血漿及びパフィーコートを吸引除去した。得られた赤血球液をHBSSで400g、5分間三回洗浄した。洗浄した赤血球1 µLを1 mLのHBSSに加えた。400 µLの懸濁液に4 µLのFITC-conjugated Annexin Vを加えて室温で15分間インキュベートした。その後、4%のPFA樹脂液を400 µL加えて、15分間固定した。固定後はFACSでPS陽性細胞数を測定した。別途洗浄した赤血球1 µLを1 mLのHBSSに加えたものを37 °Cで4時間インキュベートした後、同様にFITC染色し、PS陽性細胞数を測定した。

#### 【0049】

その結果、採血直後のPS陽性率は、何れのグループでも2%程度であったのに対し、4時間インキュベートした後では、HRG投与群でPS陽性率が抑制されていることが確認できた(図8)。

#### 【0050】

(実施例11)Zn<sup>2+</sup>誘発性ホスファチジルセリン(PS)発現とHRGによる抑制

本実施例では、Zn<sup>2+</sup>刺激した赤血球溶液試料にHRGを添加したときの、赤血球表面のPS発現量を確認した。参考例1で調製した赤血球溶液試料にZn<sup>2+</sup>を20 µMとなるように加えたものについてHRG濃度が1、10、及び100 µg/mLとなるように加えて37 °Cで1時間インキュベートした後、赤血球表面のPS発現量を参考例1と同手法により測定した。

#### 【0051】

上記の結果、HRGを添加しないグループでは赤血球表面のPS発現細胞率が40%であったのに対し、HRGを添加したグループ(1 µg/mL)で、PS発現細胞率が10%以下に抑制されることが確認された(図9)。

#### 【0052】

(実施例12)Zn<sup>2+</sup>による細胞内カルシウムの上昇とHRGによる抑制

本実施例では、Zn<sup>2+</sup>刺激した赤血球溶液試料にHRGを添加したときの、赤血球細胞内のカルシウム量について確認した。参考例1で調製した赤血球溶液試料にZn<sup>2+</sup>を20 µMとなるように加えたものについてHRG濃度が1 µg/mLとなるように加えて37 °Cで1時間インキュベートした後、赤血球細胞内のカルシウム量を測定した。

#### 【0053】

上記の結果、HRGを添加しないグループでは赤血球細胞内のカルシウム量は上昇したが、HRGを添加したグループ(1 µg/mL)で、カルシウム量が抑制されることが確認された(図10A)。また、HRGを添加しないグループでは赤血球が凝集し、血管内皮細胞に赤血球が接着するのに対し、HRGを添加したグループでは赤血球は凝集せず、血管内皮細胞への接着も認められなかった(図10B)。

#### 【0054】

(参考例2)赤血球ペルオキシレドキシニン2遊離

本参考例では、Zn<sup>2+</sup>刺激又はカルシウムイオノフォアで刺激した赤血球溶液試料につい

10

20

30

40

50

て、ペルオキシレドキシニン 2 (Peroxiredoxin 2; Prx2) 遊離量を確認した。Prxは、強い抗酸化作用を持つペルオキシダーゼの 1 種であり、細胞内において多量に存在することから、細胞の生理機能を維持する上で重要な抗酸化酵素である。赤血球からのPrx2遊離量を測定することで、赤血球の細胞傷害性を測定する指標となる。

#### 【 0 0 5 5 】

まずはじめに参考例 1 で調製した赤血球溶液試料に、 $Zn^{2+}$ を1、5、10、20及び50  $\mu M$ となるように加え、37 °Cで1時間インキュベートした後の赤血球溶液試料上清中のPrx2を非還元条件及び還元条件にて電気泳動により確認した。その結果、 $Zn^{2+}$ 濃度依存的に上清中のPrx2が増加することが確認された(図 1 1 A)。同様に参考例 1 で調製した赤血球溶液試料に、カルシウムイオノフォア (A23187) を1、5、10及び20  $\mu M$ となるように加え、37 °Cで1時間インキュベートした後の赤血球溶液試料上清中のPrx2を非還元条件及び還元条件にて電気泳動により確認した。その結果、カルシウムイオノフォア濃度依存的に上清中のPrx2が増加することが確認された(図 1 1 B)。

10

#### 【 0 0 5 6 】

(実施例 1 3)  $Zn^{2+}$ によるPrx2遊離とHRGによる抑制

本実施例では、 $Zn^{2+}$ 刺激した赤血球溶液試料にHRGを添加したときの、赤血球からのPrx2遊離の特性を確認した。 $Zn^{2+}$ を50  $\mu M$ となるように赤血球溶液試料に加え、さらに100  $\mu g/mL$ のHSA又はHRGを添加した系で37 °Cで1時間インキュベートした後の赤血球溶液試料上清中のPrx2を非還元条件にて電気泳動により確認した。その結果、HRG添加のグループでPrx2の低下が認められ、その効果はHSA添加のグループよりも顕著であった(図 1 2)。

20

#### 【 0 0 5 7 】

(参考例 3) CLPマウス血漿中Prx2確認

本参考例では、実施例 1 0 に示す方法で作製したCLPマウスから採血し、得られた血漿中のPrx2を確認した。

#### 【 0 0 5 8 】

CLP術後24時間目にマウスを麻酔し、10%のACD液を抗凝固剤として心臓から200  $\mu L$ 採血した。採血した血液を400gで遠心して血漿を得、血漿に含まれるPrx2を非還元条件での電気泳動により確認した。その結果、CLPマウスの血漿中にPrx2が認められたが、SHAMではほとんど認められなかった(図 1 3)。

30

#### 【 0 0 5 9 】

(実施例 1 4) CLPマウスでの確認

本実施例では、実施例 1 0 に示す方法で作製したCLPマウスから採取した血液での遊離ヘモグロビン、赤血球表面のPS、赤血球内遊離カルシウム濃度、各種臓器に含まれる亜鉛含量を確認した。

#### 【 0 0 6 0 】

A . CLPマウスに対しCLP誘導10分後にHRG (20mg/kg, i.v.)、HSA (20mg/kg, i.v.)、PBS (200  $\mu L$ , i.v.) を投与し、術後24時間目にマウスを麻酔し、10%のACD液を抗凝固剤として心臓から200  $\mu L$ 採血した。血漿分離後、各グループにおける血漿遊離ヘモグロビンレベルをウエスタンブロットで検出した。ウエスタンブロットの結果をデンシトメトリーで定量化し、下の棒グラフを作成した。CLPマウスにおけるPBS投与マウス(コントロール)では、明らかに血漿遊離ヘモグロビンの上昇が見られるが、HRG投与マウスでは、遊離ヘモグロビン上昇は強く抑制され、偽手術群のレベルまで低下した(図 1 4 A)。

40

#### 【 0 0 6 1 】

B . CLPマウスに対しCLP誘導10分後にHRG (20mg/kg, i.v.)、HSA (20mg/kg) 及びコントロールとしてのPBSPBS (200  $\mu L$ , i.v.) を投与した。術後24時間目にマウスを麻酔し、10%のACD液を抗凝固剤として心臓から200  $\mu L$ 採血した。採血した血液を400gで遠心し、血漿及びパフィーコートを吸引除去した。得られた赤血球液をHBSSで400g、5分間三回洗浄した。洗浄した赤血球1  $\mu L$ を1 mLのHBSSに加えた。400  $\mu L$ の懸濁液に4  $\mu L$ のFITC-conjugated Annexin Vを加えて室温で15分間インキュベートした。その後、4%のPFA樹脂液を400  $\mu L$ 加えて、15分間固定した。固定後はFACSでPS陽性細胞数を測定した。別途洗浄した赤

50

血球1μLを1 mLのHBSSに加えたものを37℃で4時間インキュベートした後、同様にFITC染色し、PS陽性細胞数を測定した。

【0062】

その結果、採血直後のPS陽性率は、何れのグループでも2%程度であったのに対し、4時間インキュベートした後では、HRG投与群でPS陽性率が抑制されていることが確認できた(図14B)。

【0063】

C. Bの実験で得た赤血球懸濁液(0h)を用いて、細胞内カルシウムレベルを測定した。細胞内フリーカルシウム測定用の蛍光プロトタイプFlou4-AMで30分間インキュベートし、FACSにより各グループの細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルを定量した。図が示すように、CLPマウスのPBS投与マウスでは正常(intact)マウスと比較し、細胞内カルシウムの上昇がみられたが、HRG投与マウスでは、上昇が有意に抑制された(図14C)。

10

【0064】

D. CLPマウスの脾臓、腎臓、肺を24時間後に採取し、RIPA緩衝液でホモジナイズした。ホモジネートの遠心上清をMetallo Assay Zn<sup>2+</sup> LS kit (Metallogenice, 千葉, 日本)を用いて測定した。CLPマウスでは正常(intact)マウスと比較し、腎臓と肺のZn<sup>2+</sup>含量が増加していたが、脾臓では両者に差はなかった。

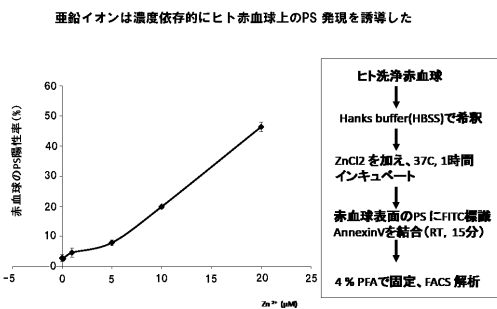
【産業上の利用可能性】

【0065】

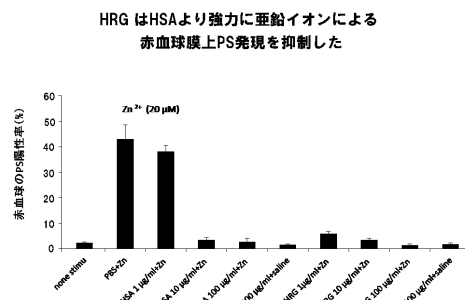
以上詳述したように、本発明の赤血球保護剤によれば、保存による赤血球劣化を抑制することができる。有効成分としてのHRGを、既存の赤血球保存用液や血液保存用液、又は今後開発される赤血球保存用液や血液保存用液に添加することで、より効果的に赤血球を保護することができる。これにより、輸血用血液製剤の内、赤血球製剤や全血製剤について、より品質の高い製剤を提供することができる。

20

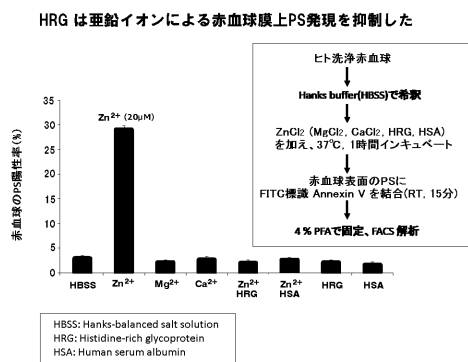
【図1】



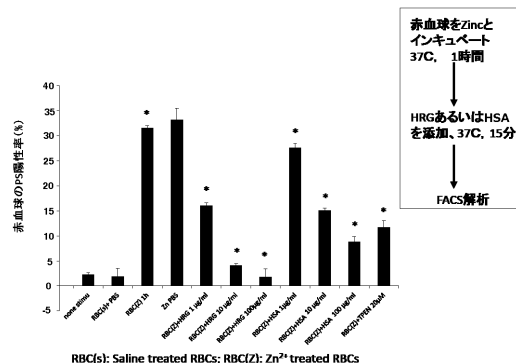
【図3】



【図2】

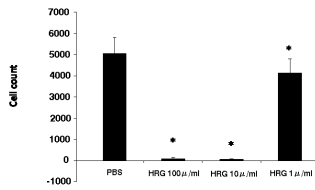


【図4】



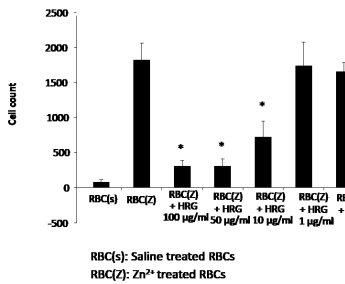
【 図 5 】

HRGによる赤血球のCollagen I への接着抑制

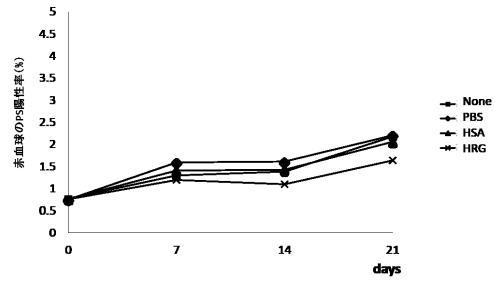


【 図 6 】

HRGによる赤血球のCollagen I への接着抑制

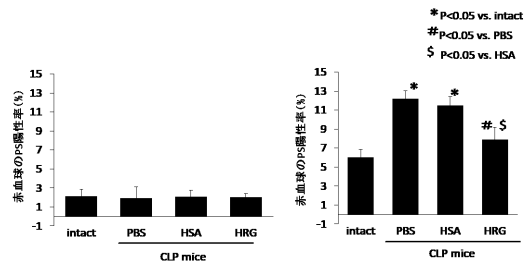


【 図 7 】



【 図 8 】

CLPマウス赤血球上のPS発現

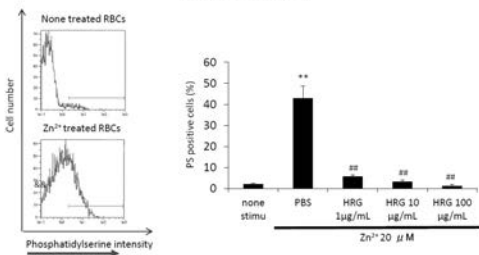


CLP敗血症マウスから採血直後の赤血球のPS陽性率

CLP敗血症マウスから採血後4時間HBS中インキュベートした赤血球のPS陽性率

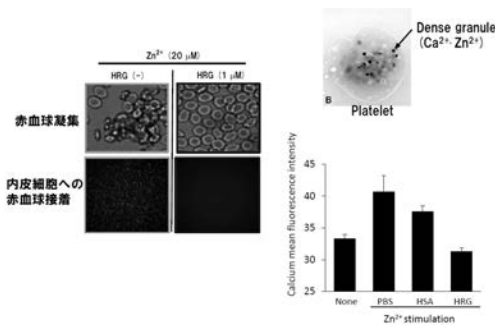
【 図 9 】

Zn<sup>2+</sup> (血小板由来) - 誘発性の赤血球膜PS発現とHRGによる抑制

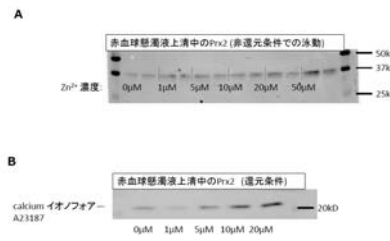


【 図 1 0 】

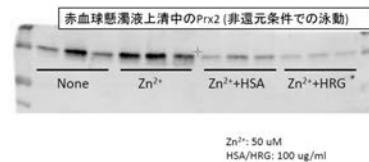
Zn<sup>2+</sup> (血小板由来) - 誘発性の赤血球凝集と細胞内カルシウム上昇



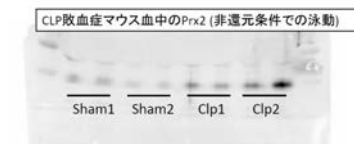
【 図 1 1 】



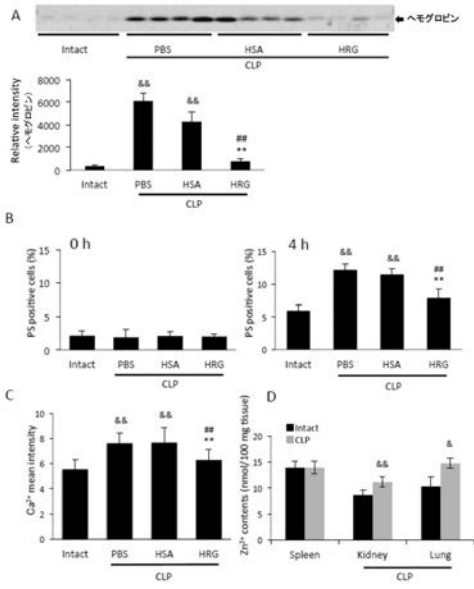
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配 列 表 】

[2018151243000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/005391
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. A61P7/00 (2006.01) i, A61K35/18 (2015.01) i, A61K47/42 (2017.01) i, A61P7/06 (2006.01) i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. A61P7/00, A61K35/18, A61K47/42, A61P7/06  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) @@@JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WAKE, H et al., Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic Lethality through Regulation of Immunothrombosis and Inflammation, EBioMedicine, 2016, vol. 9, pp. 180-94, ISSN 2352-3964, Abstract	1-9
A	WO2013/183494 A1 (OKAYAMA UNIVERSITY) 12 December 2013, claims, examples & US 2015/0141322 A1, claims, examples & JP 2016-53022 A & US 2016/0146835 A & EP 2859898 A1	1-9
P, X	WAKE, H. et al., Histidine-rich glycoprotein protects vascular endothelial cells and red blood cells in sepsis, Intensive Care Med Exp, 11 September 2017, vol. 5, suppl. 1, pp. 18, ISSN 2197-425X, column P24, entire text	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02.03.2018		Date of mailing of the international search report 13.03.2018
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 0 5 3 9 1												
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61P7/00(2006.01)i, A61K35/18(2015.01)i, A61K47/42(2017.01)i, A61P7/06(2006.01)i														
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61P7/00, A61K35/18, A61K47/42, A61P7/06														
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2018年													
日本国実用新案登録公報	1996-2018年													
日本国登録実用新案公報	1994-2018年													
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)														
C. 関連すると認められる文献														
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
A	WAKE, H. et al., Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic Lethality through Regulation of Immunothrombosis and Inflammation, EBioMedicine, 2016, Vol.9, p.180-94, ISSN 2352-3964, Abstract、等	1-9												
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献													
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの													
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの													
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献													
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願														
国際調査を完了した日 02.03.2018	国際調査報告の発送日 13.03.2018													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 伊藤 基章 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 4146												



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 0 5 3 9 1
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2013/183494 A1 (国立大学法人 岡山大学) 2013.12.12, 特許請求の範囲、実施例、等 & US 2015/0141322 A1, Claims, Examples & JP 2016-53022 A & US 2016/0146835 A & EP 2859898 A1	1-9
P, X	WAKE, H. et al., Histidine-rich glycoprotein protects vascular endothelial cells and red blood cells in sepsis, Intensive Care Med Exp, 2017.09.11, Vol.5, Suppl.1, p.18, ISSN 2197-425X, P24 欄, 全文	1-9

## フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(出願人による申告)平成29年度～令和元年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、医療分野研究成果展開事業、産学連携医療イノベーション創出プログラム(ACT-M)「敗血症治療のためのHRG血液製剤の創出」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 衷 輝

岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

(72)発明者 森 秀治

岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

(72)発明者 阪口 政清

岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

Fターム(参考) 4C076 AA22 BB18 CC14 EE41Q FF63

4C087 AA01 AA02 BB36 CA04 DA17 MA05 NA03 ZA55

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。