

別添 2

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

臨床応用可能な人工赤血球の創製 に関する研究

(研究課題番号 : H12-医薬-009)

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土田 英俊

(早稲田大学 理工学総合研究センター)

平成 15 (2003) 年 4 月

別添 3

目次

I. 総括研究報告書	1~5
土田英俊（早稲田大学 名誉教授／理総研 顧問研究員）	
II. 分担研究報告書	
1. 土田英俊（早稲田大学 名誉教授／理総研 顧問研究員）	6~32
2. 池田久實（北海道赤十字 血液センター 所長）	33~42
3. 小林紘一（慶応大学 医学部 教授）	43~61
4. 末松 誠（慶応大学 医学部 教授）	62~66
5. 高折益彦（東宝さとう病院 名誉院長）	67~68
6. 外 須美夫（北里大学 医学部 教授）	69~70
7. 小川 龍（日本医科大学 教授）	71~72
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	73~75
IV. 研究成果の刊行物・別冊	

臨床応用可能な人工赤血球の創製 に関する研究

主任研究者 土田 英俊 早稲田大学 名誉教授/理工学総合研究センター 顧問研究員

研究要旨 本研究は、体内への必要充分量の酸素運搬と高い安全度を有する、臨床応用可能な人工赤血球の創製を目的としている。このため品質と安全が保証できる製造法の確立、物性と機能の規格を明確にすると共に、動物実験による厳密な評価を得て、臨床応用に適合する人工赤血球として完成させる。第 2 期 最終年度 (平成 14 年度) に得られた研究成果は以下の通り。①高効率造粒条件の設定と試作多段連結式造粒装置の無菌運転により 4 L バッチの製造プロセスを実現、製造試料は研究室にて決定された規格に合致し、菌体は検出されなかった。総計 15L を調製して動物試験に供与した。②Hb 小胞体分散液中のエンドトキシン定量法、Hb 溶液中の血液型物質定量法を確立、製造工程の管理、製剤の品質管理精度を向上させた。③カタラーゼ内包により Hb 小胞体のメト化の進行を 3.5 倍遅延できることを *in vivo* にて確認。④ヒト血液補体活性、あるいはラット投与後の補体価や白血球やリンパ球の動態観察では、試料混合における影響はほとんど認められなかった。⑤ハムスターを用いた 50% 出血性ショック蘇生モデルの微小循環動態観測から脱血液投与と同等の酸素運搬効果を実証。また、リコンビナントアルブミンに分散させた Hb 小胞体が出血ショック蘇生液として有効であることをラットへの投与試験から確認した。⑥Hb 小胞体のラット 20ml/kg の単回投与、40% 血液交換・長期生存試験では、肝・脾臓の一過性肥大とマクロファージへの捕捉が観測されたが、7 日後には正常値に戻った。生化学的検査ではリパーゼの一過性の亢進以外に顕著な変動は認められなかった。⑦ラット反復投与 (10mL/kg/日の 14 日間) ならびに 2 週間生存試験では、全例 (14 例) 生存し体重も増加し続けた。血中の脂質成分濃度の増大とリパーゼの亢進以外の変動を認めず、14 日後には正常値に復した。大量投与に伴い細網内皮系組織にヘモジデリンの沈着が認められた。⑧人工赤血球の安全性に極めて重要な評価系として、微小循環における一酸化窒素 (NO) の bioavailability 評価系を確立し、血液成分からの NO 放出系に関する知見を得た。⑨ハムスター血液置換時の微小循環での血流及び白血球動態観測では、Hb 小胞体は血圧維持に有効、白血球による細胞障害を抑制の可能性が示唆された。⑩Hb 小胞体投与による血管の透過性亢進作用をもつ物質産生は認めなかった。⑪^{99m}Tc 標識-Hb 小胞体投与 (25vol%) ラットの血中半減期は 24 時間、45 時間後には主として肝臓、骨髄、脾臓に分布した。⑫更に、全合成系酸素運搬体では、近位塩基を有するプロトヘム誘導体を合成、アルブミン複合体の酸素結合反応から安定構造を特定。⑬ヒト血清アルブミン二量体の合成法を確立、物性および血球成分への影響に関する知見を得た。⑭人工赤血球の前臨床治験、臨床治験の計画に関して国内外へのアンケート調査を実施、臨床治験計画を作成した。以上、人工赤血球の無菌・大量製造、物性規格、ヒト血液適合性、小動物を用いた安全性、有効性試験など当初の目標を完了させた。

分担研究者

池田 久實	北海道赤十字血液センター	所長
小林 紘一	慶應義塾大学 医学部	教授
末松 誠	慶應義塾大学 医学部	教授
高折 益彦	東宝塚さとう病院	名誉院長
外 須美男	北里大学 医学部	教授
小川 龍	日本医科大学	教授

A. 目的

人工赤血球として最有望なヘモグロビン (Hb) 小胞体の効率的製造方法を確立し、物性値の計測法と規格値の確定、充分量の酸素を安全に体組織に運搬できる臨床応用可能な人工赤血球の創製を目的としている。これに追従させて全合成系酸素運搬体 (アルブミン-ヘム) についても検討する。

平成 14 年度では、①連続製造装置を用いた製造工程の高効率化、基準合致試料としての Hb 小胞体の製造・精査並びに動物試験への供与、②エンドトキシン定量法、血液型物質定量法の確立、③カタラーゼ内包によるメトヘモグロビン生成抑制の評価、④Hb 小胞体混合系におけるヒト血液補体、ラット投与後の補体価、白血球やリンパ球の動態観察、⑤ハムスター背部皮下に顕微観察用窓枠を設置して 50% 出血性ショック状態と Hb 小胞体投与後の蘇生を観察、循環動態、血液ガスなどの定量評価との相関解明。また、血漿増量剤としてリコンビナントアルブミンをラットに Hb 小胞体と同時投与する効果の確認。⑥Hb 小胞体のラット 20ml/kg の単回投与、40% 血液交換・長期生存試験、⑦ラット Hb 小胞体の反復投与 (10mL/kg/日の 14 日間) ならびに 2 週間生存試験、⑧微小循環における一酸化窒素の bioavailability 評価系の確立、⑨Hb 小胞体による血液置換時の微小循環動態ならびに白血球機能に及ぼす影響、⑩Hb 小胞体投与後の全身の血管透過性へ及ぼす影響、⑪^{99m}Tc 標識-Hb 小胞体投与ラットの各臓器への分布変化の経時的定量と有効時間を測定、⑫更に、アルブミン-ヘムに関しては、近位塩基を有するプロト

ヘム誘導体の合成とアルブミン複合体の酸素結合反応の計測、⑬ヒト血清アルブミン二量体の物理化学的特徴と溶液物性の解明、⑭臨床適応に対応させる製剤の安全性と有効性に関する評価基準の指針と臨床試験計画の作成を行い、人工赤血球の無菌・大量製造、物性規格、ヒト血液適合性、小動物を用いた安全性、有効性試験を完了させることを目的としている。

B. 方法

①Hb 小胞体製造工程では、造粒時の Hb 濃度、脂質濃度を再検討。更に、設計、試作した多段連結式造粒装置を用いて 4L/バッチの調製を行いスケールアップにおける効率評価。②エンドトキシン定量は Hb 小胞体を界面活性剤で可溶化してリムルス試験を実施。より高感度定量法としてパイロセップ法も検討。③各種濃度のカタラーゼを内包させた Hb 小胞体を調製し、*in vivo* 投与試験におけるメト化率の推移を測定。

④免疫系への影響に関しては、ヒトあるいはラット血清と試料を *in vitro* で混合し補体価 CH50 を測定。*in vivo* での採血液は自動血球測定装置にて血球数、フローサイトメリーにて白血球ポピュレーションとリンパ球サブセットを測定。補体価 CH50 は *in vitro* データと比較。

⑤ハムスターを用いて非侵襲・無麻酔により微小循環動態を直接観測する方法を利用して、Hb 小胞体投与による出血ショックからの蘇生過程を追跡。また、リコンビナントアルブミンに分散させた Hb 小胞体を出血ショック状態のラット(麻酔下)に投与し、50%出血ショック蘇生試験では酸素運搬機能を中心に、血液ガス、乳酸、Hct、血圧、心拍数、呼吸数、体温、Hb 小胞体濃度、メト化率、血球数について投与後 6 時間まで計測。有意差検定にはアルブミンあるいは脱血液投与群を対照とした。

⑥Wistar 系ラットに Hb 小胞体を単回投与後(20 mL/kg)に血液生化学検査を実施。脂質成分、肝機

能パラメータに関する項目を中心に 7 日後までを計測。ラットを用いた 40%血液交換試験では血圧、心拍数、血液ガス測定、生化学的検査、主要臓器は組織病理学的検査を実施(H/E, Berlin blue 染色)。肺微小循環は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観測。⑦ラットを用いた反復投与試験では 10 ml/kg/day で 2 週間連日投与。体重、血球数、ヘマトクリット、血清中の Hb 小胞体濃度、尿検査を実施。最終投与日翌日あるいは 2 週間後に血液生化学的検査、血液凝固検査、組織病理学的検査などを実施。

⑧一酸化窒素 (NO) の bioavailability 評価系には、非蛍光物質; diaminofluorescein (DAF)-2 AM が細胞内で NO と結合して蛍光複合体 (DAF-2Triazole) を形成する原理を利用。Wistar 系ラットに DAF-2 AM を投与し、回盲部腸間膜微小循環での蛍光強度変化を倒立型生体ビデオ顕微鏡にて観測。⑨白血球動態への影響を調べるため、Hb 小胞体で血液置換(総計 3 mL)した Golden hamster の細静脈にロイコトリエン B4 (LTB4) を局所投与し、光学顕微鏡下に白血球の粘着(adhesion)、血管外遊走(migration)を計測。⑩血管透過性に関する検討では、Hb 小胞体を投与した Wistar 系ラットに血管透過性の指標としてポントカインスカイブルーを静脈内投与。60 分後に主要臓器を摘出して、590nm での吸光度から細胞間室に移行した色素量を定量。

⑪放射性同位元素 Technetium-99m($^{99m}\text{TcO}_4$) でラベル化した Hb 小胞体をラット尾静脈より投与。γカメラとシンチレーションカウンターを用いて血中残存率および体内分布の推移を計測。

⑫全合成系では軸塩基の異なる 5 種のプロトヘム誘導体を合成。UV-vis. スペクトル変化から、Drago 式を用いて酸素親和性($P_{1/2}$)を決定。rHSA との複合体として UV-vis. スペクトルにおける酸素錯体吸収の経時変化から、酸素錯体半減期 ($\tau_{1/2}$)(25 °C) を決定。⑬ rHSA 二量体は bismaleimidehexane (BMH)を架橋剤として合成。

分子量、モル吸光係数 (ϵ_{280})、 α -ヘリックス含量、コロイド浸透圧、溶液粘度など基礎物性を常法により測定。

⑭前臨床治験および臨床治験計画に関しては、国内外の主な研究施設にアンケート調査を実施、その結果を集計し研究班で協議する。

C. 結果および考察

①Hb 小胞体の製造工程では、平成 13 年度に確立した前処理脂質粉末を使用し、造粒時の Hb 濃度および脂質濃度を再設定し大幅な効率向上が認められた。混合脂質粉末の前処理により、透過速度の増大により脂質濃度増大が可能となり、Hb 収率を向上できた。また、平成 12 年、13 年度に開発した多段式造粒装置と連結式造粒装置の長所を融合させ多段連結型造粒装置を設計・試作した。本試作機を用いた 4L/バッチの Hb 小胞体の調製からスケールアップ時の基礎データ取得を完了、調製工程を通しての検討課題に解決の目途を付けた。②品質管理の重要項目としては、エンドトキシンの定量法を確立した。Hb 小胞体分散液では混在するエンドトキシンの一部が二分子膜中に存在し、常法のリムスル試験では正確に定量できない。decaethylene glycol monododecyl ether($\text{C}_{12}\text{E}_{10}$)で Hb 小胞体を可溶化させこの課題を解決した。可溶化剤の濃度設定により検出感度限界は 0.1 EU/mL となった。更に、パイロセップ法の併用により 0.001EU/mL の高検出感度を達成した。また、ヒト赤血球から調製した Hb 溶液中の A 型物質定量法ではグリコホリン A とマウスモノクローナル抗体を用いた競合 EIA 法を確立、80-325 ng グリコホリン A/ml の検出感度を得た。

③Hb 小胞体中の Hb はヘム中心鉄(II)の電子移動により鉄(III)のメト Hb になった場合(メト化)、酸素運搬機能を失う。生体内では自動酸化の他、各種活性酸素類(スーパーオキシドアニオン、過酸化水素など)の関与が示唆されるが、*in vitro* の検討により、メト化に関与する活性酸素種は主

に H₂O₂であることが明らかとなった。過酸化水素消去剤としてカタラーゼを内包させた Hb 小胞体では、ラット *in vivo* の 50%メト化時間をカタラーゼ未内包系の 3.5 倍以上の 39 hr まで延長し、酸素運搬体としての有効半減期を大幅に延長できた。

④免疫系への影響は製剤の安全度を保証する重要項目であるので、*in vitro* および *in vivo* から詳細に検討した。ヒト血清に 20%および 40%v/v の Hb 小胞体を混合しても補体価 CH50 の低下はみられない。ラット血清を用いた *in vitro* 試験でも Hb 小胞体混合による CH50 の変化はなく、Hb 小胞体は補体を活性化しないことが明らかとなった。ラットへの投与試験では、投与 3 日目に 10-20%の補体価が低下し、徐々に回復した。

白血球では投与 6 時間後に顆粒球%の上昇、リンパ球%の減少がみられたが、1 日後には回復するので影響は少ないと考えられた。白血球数の変動は食食作用との関連が示唆される。またそれらの程度は空リポソームに比して Hb 小胞体で変動が大きいため、内包 Hb に関する定量評価が必要である。Hb 小胞体投与は末梢血白血球および補体に及ぼす影響は小さく、また一過性であったことから、宿主の生体防御機能は十分維持されると考えられる。rHSA-Heme では、補体価 CH50 の減少傾向、SC5b-9 の増加傾向が見られたがその程度は小さく、rHSA-Heme の補体系への影響は小さいと考えられた。血小板活性化作用は全く認めない。

⑤無麻酔ハムスターを出血ショック状態とすると、抵抗血管(150 μ m 径)の収縮により組織内血流速度と酸素分圧が低下するが、Hb 小胞体の投与によりこれが改善される様子を確認。また、麻酔下ラットの循環血液量の 50%を脱血した後、リコンビナントアルブミンに分散させた Hb 小胞体を投与したところ、血圧も血液ガス組成も直ちに回復し、脱血液の投与と同等であった。⑥Hb 小胞体のラット 20 mL/kg 単回投与後の生存試験では、細網内皮系への捕捉により投与 2 日後に肝脾の一過性肥大を認めたが、7 日後には正常値に戻った。肝

機能や腎機能を反映する生化学パラメータに異常は認めなかった。リパーゼは一過性の有意な亢進を示したが、アミラーゼには変動は見られなかった。代謝過程で脂質成分が血清中に出現するが、7 日後には正常値に復した。Hb 小胞体の 40%血液交換試験でも脾臓の一過性肥大が認められ、組織病理学的にはマクロファージが Hb 小胞体を捕捉している状態が観測された。血液生化学的検査でも単回投与の場合と同様の変動が見られた。⑦Hb 小胞体のラット反復投与試験(10 mL/kg/day x 14 days)では、前例生存し体重増加が持続された。血球数や尿検査、血圧などに異常は無かった。最終投与翌日、脾臓と肝臓の肥大、血中の脂質成分の増大、リパーゼの亢進が認められたが、14 日後には正常値に復した。細網内皮系にはヘモジデリンの沈着が認められた。

⑧血管内皮細胞の機能変動を *in vivo* で評価する系として NO のバイオイメージング技術の確立を行い、腸間膜における血管内皮細胞由来の NO のリソースについて興味深い知見を得た。詳細な解析の結果、血液成分からの NO の放出系の存在が示唆され、微小血管における NO に新しい知見が加えられた。今後、酸素運搬体の開発に極めて重要な評価系となる。

⑨Hb 小胞体投与後の白血球動態に関しては、LTB₄ の投与による白血球の細静脈壁への粘着及び壁肥厚は、アルブミンと比較して Hb 小胞体では有意に抑制された。また、血管外遊走白血球数は、Hb 小胞体で有意に減少した。Hb 小胞体による約 40%置換では、心拍数、体血圧は保たれ、また起炎物質による血管壁への白血球の粘着、血管外遊走が抑制された。白血球活性の抑制に関しては今後の詳細な検討が必要である。Hb 小胞体投与後の血管透過性では、対照群に比較して差を認めないことから、Hb 小胞体が血管透過性を亢進しないことが示された。

⑩^{99m}Tc 標識 Hb 小胞体を利用して、Hb 小胞体は主に肝臓、脾臓、骨髄での食食作用により血中

から消失することを定量的に示した。ラットでの血中半減期は 24 時間であった。

⑫全合成系酸素輸液では酸素結合部位となるヘム誘導体の分子構造により酸素親和度や酸素錯体安定度が調節できる。5 種類のプロトヘム誘導体 (FePP) を設計・精密合成した。極性の相違を利用して簡便に精製する方法を見出し、比較的高収率で目的物が得られた。疎水性の高い化合物では rHSA と安定な複合体を形成した。置換基の構造としてはメチル基よりエチル基の方が、また、軸塩基としてはヒスチジルグリシル基を導入した方が酸素錯体の安定度は増大することが明らかになった。⑬更に、ヘム誘導体の新しい担体として組換えヒト血清アルブミン(rHSA)二量体を合成し、その物理化学的特徴、及び溶液物性を調べた。分子量はアルブミン単量体の二倍に一致、pI 値、 α -ヘリックス含量、熱安定度、分子結合能は単量体と同等であった。膠質浸透圧 (COP) には明確な相違を認め、rHSA 5.0 wt%溶液と同じ COP を有する rHSA 二量体溶液の濃度は、8.5 wt%であった。*In vitro* での検討では血球成分との相互やレオロジー変化は認めなかった。

⑭前臨床、臨床治験の計画に関する国内外へのアンケート調査結果を集計し、希釈式自己血輸血、一部緊急手術での輸血を施行する患者を対象とする臨床治験を計画した。特に医療倫理面での配慮、明確な有効性の効果判定を得ることに重点を置いた。

D. 結論

平成 14 年度 (第 2 期最終年度) では、本研究班にて決定された物性規格に合格する Hb 小胞体を 4 L/バッチの無菌製造設備にて製造し、動物試験に供することができた。また、窒素無菌充填して常温保管できるので、試料製造スケジュールに依存せず、統一規格にて動物試験計画が組めることも大きな利点である。そのため、今後多くの研究施設にて動物試験が実施されよう。更に、製造工

程や品質の管理に重要なエンドトキシンを定量する方法を確立できたことも重要な成果である。ラットを用いた単回投与試験では、Hb 小胞体の血中半減期は 24 時間程度であり、肝臓、脾臓、骨髄などの細網内皮系に捕捉され、7 日後には代謝されている。また、血液生化学試験では血中の脂質成分の増大、リパーゼの一過性亢進が認められた以外に異常は認められなかったため、Hb 小胞体の脂質膜成分の代謝過程や代謝物の影響を詳細に検討する必要がある。懸念されていた補体活性や白血球への影響が特に認められなかった点は重要であるが、治験に入るには今後霊長類を用いた詳細な検討が必要である。また、2 週間に亘る連日の 10ml/kg の負荷投与においても全個体 (14 個体) が生存し、検視所見からは全く異常を認めず、不可逆に変動するパラメータは皆無であったことは、Hb 小胞体の安全性の高さを証明する結果であるが、今後動物を変えて (例えば霊長類)、用量をもっと上げた連続投与試験が待たれるが、その場合には投与方法に工夫が必要であろう。また、鉄沈着が認められたのでその点についても注意を要す。ラットやハムスターによる出血性ショック蘇生試験では、返血液と同程度の酸素運搬効果が証明された。懸念されていたメト化生成は急性使用では問題なく、過酸化水素消去系の共封入により解決できる知見は更に性能を向上させた次世代 Hb 小胞体の基本設計になろう。また、全合成系のアルブミン-ヘムは代謝経路を考慮したプロトヘム誘導体の合成やアルブミン二量化にも成功し、ヘムと包接体の両面からより高性能で安全性の高い全合成系創製に関する知見が得られた。

総括してかなり踏み込んだ安全性試験においても顕著な副作用を認めず、現在のところ最も安全性と効果の高い人工赤血球であることが再認識できた。既に、GMP 対応製造設備の基本設計や治験に向けた計画もまとまっているので、実施企業による製造設備の建設、非臨床試験を経た治験実施へと踏み込む段階に来ている。

分担研究報告書

臨床応用可能な人工赤血球の創製に 関する研究

- 分担課題： 1. 多段連結型造粒装置の評価と造粒条件の最適化
 2. エンドトキシン定量法の確立
 3. カタラーゼによるメトヘモグロビン生成抑制
 4. 放射化ラベルを利用した Hb 小胞体の体内動態評価
 5. 出血ショックおよび Hb 小胞体投与後の皮下微少循環動態の観測
 6. 近位塩基を有するプロトヘム誘導体の合成とアルブミン複合体の酸素結合反応
 7. ヒト血清アルブミン二量体の物理化学的特徴と溶液物性

主任研究者	土田 英俊	早稲田大学 名誉教授	理工学総合研究センター 顧問研究員
研究協力者	武岡 真司	早稲田大学大学院 理工学研究科	助教授
	小松 晃之	早稲田大学 理工学総合研究センター	講師
	酒井 宏水	早稲田大学 理工学総合研究センター	講師
	小柳津研一	早稲田大学 理工学総合研究センター	講師
	宗 慶太郎	早稲田大学 理工学総合研究センター	助手
	黄 宇彬	早稲田大学 理工学総合研究センター	研究員

研究要旨

第 2 期最終年度 (平成 14 年度) では、ヘモグロビン(Hb)小胞体の量産工程を確認すると共に、本工程にて製造された試料規格を記録し、有効性の評価を行った。造粒工程では、最も効率の高い Hb 濃度、脂質濃度を決定し、多段連結式造粒装置を運転して効率や収率向上を確認、実際に 4L/バッチを実施。無菌工程の評価法の一つとして、エンドトキシン定量法を界面活性剤による Hb 小胞体の可溶化を利用して確立した。Hb 小胞体の有効半減期はメト Hb への転化速度と血中滞留時間の積で表されるが、カタラーゼの内包により Hb 小胞体の *in vivo* のメト化半減期を 2.5 倍以上 (39 時間) 延長させることに成功。また、^{99m}Tc の放射化ラベルによる体内動態の計測から Hb 小胞体の血中半減期はラットでは約 24 時間と決定できた。血中から消失した Hb 小胞体は主に肝臓、脾臓、骨髄の細網内皮系に分布してから代謝されることを定量値として示せた。出血性ショック時の Hb 小胞体投与が蘇生、回復に有効であることをハムスター微少循環動態の観測から実証、酸素輸液としての有効性を示せた。全合成系酸素輸液として、代謝経路を考慮して近位塩基を有するプロトヘム誘導体(FePP)を分子設計・精密合成した。ヒト血清アルブミン(rHSA)に包接させた新規アルブミン-プロトヘム複合体(rHSA-FePP)を調製し、酸素錯体安定度とヘム構造の相関を明らかにした。また、新しいヘム包接媒体として rHSA 二量体の効率高い合成ならびに、精製法を確立し、高次構造や表面状態、膠質浸透圧や溶液粘度など物性に関する知見を集積した。

1. 造粒条件の最適化と多段連結式造粒装置の評価

A. 目的

Hb 小胞体の造粒工程において、Hb 濃度の増大は単位脂質重量当りの Hb 重量比、Hb 内包効率の向上に有効であり、また脂質濃度の増大は Hb の内包率の向上の有効である。しかし、高濃度 Hb 溶液に高濃度で脂質を分散させた場合、溶液粘度が著しく増大する。小胞体/Hb 分散液を多孔質フィルターに高圧で透過させるエクストルージョン法では、溶液粘度の増大は透過速度や透過量低下の原因となる。平成 14 年度は、Hb 濃度および脂質濃度の最適化条件を設定することを目的とした。また、平成 12 年、平成 13 年度に報告した多段式造粒装置と連結式造粒装置の長所を融合させた多段連結型造粒装置を設計・試作した。本試作機を用いて設定した最適濃度条件で 4L/バッチの Hb 小胞体を調製し、基礎データの取得を完了した。

B. 方法

1) Hb 濃度、脂質濃度の最適化

小胞体凍結乾燥粉末濃度 ([Lipids]=5~11g/dL) および Hb 濃度(35~40g/dL)を変化させエクストルージョンを行った。得られた Hb 小胞体の Hb 内包率、脂質収率、フィルター透過速度(220nm)、フィルター単位面積当たりの脂質処理効率を測定し、最適濃度を決定した。

2) 多段連結式造粒装置

設計、試作した多段連結式造粒装置を用いて 2~4L/bach の造粒を行った。フィルター透過速度、透過容量、Hb、脂質収率についてデータを取得した。

C. 結果および考察

1) Hb 濃度、脂質濃度の最適化

Hb 濃度を 35, 38, 40g/dL に調整し、脂質濃度 5g/dL でエクストルージョンを行った。透過速度は Hb 濃度に依存し、Hb 濃度の増大に従って低下し

た(図 1 a)。35g/dL の Hb 溶液を使用した方が、38g/dL に比べ、透過速度は 3 倍以上速かった。また、Hb 濃度の低下に伴い脂質収率は上昇し、35g/dL 使用時には 70%以上の値を示した(図 1 b)。さらに、フィルター単位面積当たりの処理量も 13.2~22.0mL/cm² 以上と従来(2.2~3.3mL/cm² 程度)よりも大幅に向上した。一方、Hb 内包率は Hb 濃度低下に伴い僅かに低下するものの、35g/dL でも 1.7 と規格値の範囲(1.7~1.9)に収まった。

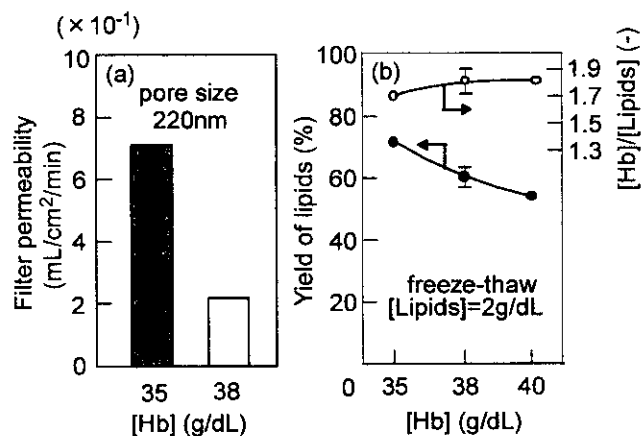


Fig. 1 Relationship between concentration of Hb in mixing of lipids and (a) filter permeability, (b) yield of lipids.

次に、Hb 濃度を 35 g/dL に固定し、脂質濃度を検討した。脂質濃度の上昇に伴い、Hb 収率も比例的に増加した。脂質収率はどれも 70%程度と高い値を示した。これは脂質濃度が上昇しても、Hb 溶液に速やかに分散し、未水和脂質やフィルター目詰まりが生じなかったためである。一方、脂質濃度 11g/dL では、孔径 3000、800nm のフィルターは透過したものの、650nm フィルター以降は透過できなかった。

脂質粉末の Hb 溶液に対する分散性が高いため、脂質濃度増大に伴う透過速度の低下は脂質濃度が 7g/dL までは無く、したがって単位面積当たりの脂質処理量は 7g/dL が最も高い値を示した(図 2)。脂質濃度が 9g/dL 処理では、透過速度が減少し、臨界圧力以上(450nmΦ、300nmΦ で 1.0MPa、220nmΦ で 1.5MPa)の圧力印加が必要であった。

よって、今回は圧力損失を考慮して 9g/dL 以上の脂質濃度は適用しなかった。以上より、収率、造粒処理効率を考慮して、脂質濃度を従来の 5g/dL から 7g/dL に変更した。これにより、Hb 収率は 1.4 倍向上した。

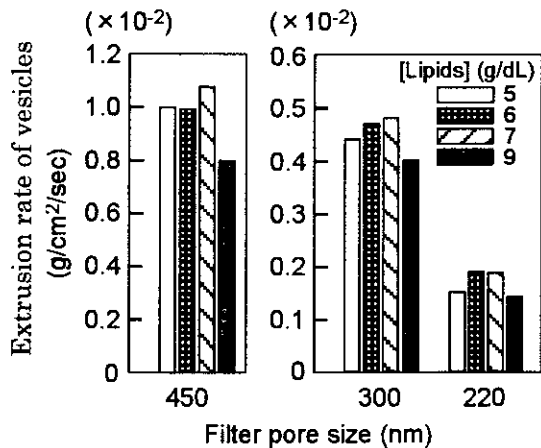


Fig. 2 Relationship between concentration of lipids in Hb solution and weight of extruded vesicles in extrusion.

2) 多段連結式造粒装置

平成 13 年度までに多段式による膜面積の増大と処理量の増大、連続式による作業効率の向上と造粒工程時間の短縮を検討してきた。平成 14 年度では、これらを組合わせた多段連結式装置を設計した (図 3)。本造粒装置には独立に 6 段のフィルターをセットでき、直列あるいは並列に連結可能。

本装置を用いて富士フィルム製 FM300 + FM80 (印加圧 1~2MPa)、FM65 + FM45 (印加圧 3MPa)、FM30 (印加圧 3MPa)、FM22 + FM22 (印加圧 3MPa) と順次フィルター透過させた。透過挙動を図 4 に示す。

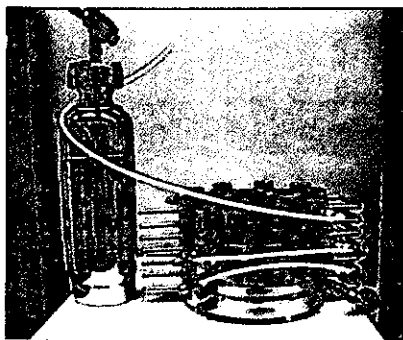


Fig. 3 Multistage-connecting extruder.

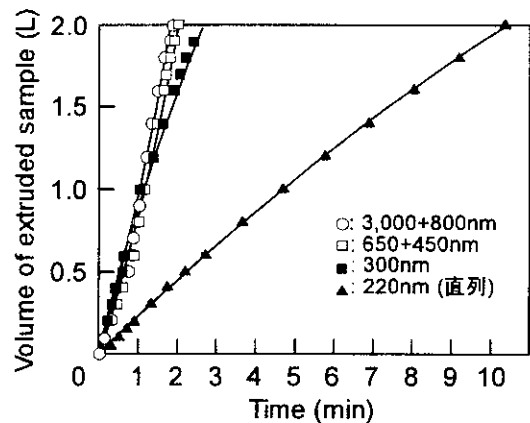


Fig. 4 Permeation profile of the HbV with multistage-connecting extruder.

平成 13 年度に報告した脂質凍結融解前処理法の適用により、粒子径が 500nm に制御された脂質粉末を使用しているため、全てのフィルターで目詰まり無く処理でき、透過挙動は直線的であった。フィルター孔径 3000~300nm では全て 3 分以内に透過、孔径 220nm では 10 分で 2L の処理が完了した。従って、20 分以内で全てのフィルター処理が完了した。本装置は容量損失が少なく、溶液回収率は 96% であり、従来より向上できた。4L スケールを 3 回試み、全てが成功した。内包効率や粒子径は従来と同等に制御されており、本装置が Hb 小胞体の調製に有効であることが確認された。

D. 結論

平成 14 年度は製造工程において造粒条件、装置の設定を完了、また脱一酸化炭素化工程において酸素バブルの採用により 10 倍効率を向上させることに成功した。これにより、動物試験用の試料として、規格に合致した Hb 小胞体を総計 15L 調製した。未内包 Hb は濃縮工程を経て利用できるため、循環システムの構築による Hb 収率向上の目途も立った。

2. エンドトキシン定量法の確立

A. 目的

Hb 小胞体の品質管理において、発熱性物質であるエンドトキシン(リポポリサッカライド, LPS)定量法の確立が不可欠である。LPS は小胞体の二分子膜に取り込まれるため、界面活性剤で小胞体を可溶化し LPS を遊離させる前処理操作が必要となる。本研究では、界面活性剤の処理による Hb 小胞体のエンドトキシン定量法の確立を目的とする。既知量の LPS を試料に添加して回収率を求めて定量法の妥当性を確認、さらに検出感度向上のために LPS を特異的に吸着するパイロセップ (ヒスチジン結合アガロースゲル) の適用を検討した。

また、Hb 溶液中のエンドトキシン除去法として陽性荷電フィルターによる吸着除去に着目、付加試験により効果を明らかにした。

B. 方法

1) C₁₂E₁₀ による Hb 小胞体の可溶化

Hb 分散液([Hb]=2 g/dL)200 μL に decaethylene glycol monododecyl ether(Sigma 社製, C₁₂E₁₀, 0~5.0 vol%)を 800 μL 混合攪拌して可溶化後、660 nm の濁度を測定した。

2) C₁₂E₁₀ 溶液濃度の影響

LPS 標準溶液([LPS]=20 ~ 0.01 EU/mL)200 μL に 2 vol% の C₁₂E₁₀ 溶液を 800 μL 加えて攪拌後、C₁₂E₁₀ 溶液濃度が 1.6 ~ 0.05 vol% となるように注射用水で希釈してから LAL 試薬(和光純薬社製)と混合し、Toxinometer(和光純薬社製)でゲル化時間(Tg)を測定して検量線を作成した。

3) LPS 回収率の測定

a) 精製 Hb 溶液 : LPS 標準溶液([LPS]=1 ~ 0.001 EU/mL)に各々精製 Hb 溶液([Hb]=2 g/dL)を加えてリムルス試験を行い、ゲル化時間から LPS 濃度を求め、回収率を算出した。

b) 混合脂質 : LPS 標準溶液([LPS]=2 ~ 0.1

EU/mL)に各々混合脂質(1.2 g/dL)を加え、液体窒素で凍結融解を 3 回行って LPS 担持小胞体(LPS-Vesicle)を調製した。2 vol% の C₁₂E₁₀ 溶液によりこれを可溶化させた後リムルス試験を行い、同様に回収率を求めた。また、添加 LPS 濃度が 1.0 EU/mL の試料では C₁₂E₁₀ 溶液を加えずに測定し、測定値の相違を確認した。

c) Hb 小胞体 : LPS 標準溶液([LPS]=10 ~ 0.1 EU/mL)に各々 Hb 小胞体([Hb]=10 g/dL)を加え、b)と同様に可溶化させた後リムルス試験を行い、回収率を求めた。

4) パイロセップ法による Hb 小胞体の LPS 定量

LPS 標準溶液([LPS]=0.1 ~ 0.0001 EU/mL)に Hb 小胞体([Hb]=10 g/dL)を添加して C₁₂E₁₀ 溶液で可溶化させた試料を、各々パイロセップを充填したキャピラリーカラム(和光純薬社製)で吸引して LPS を吸着させた。洗浄液を透過後、LAL 試薬を吸引して共に測定用試験管に移し、ゲル化時間を測定して回収率を求めた。

5) 陽性荷電フィルターによる LPS 除去

Charged Durapore Filter(Millipore 社製, 孔径 0.22 μm, 膜面積 12.6 cm²)をオートクレーブ滅菌し、フィルターホルダーに装填後、精製 Hb 溶液(200 mL, [Hb] = 20 g/dL, [LPS] = 1.2 EU/mL)を 20 mL ずつ透過させ、透過後の LPS を定量した。

C. 結果及び考察

1) 界面活性剤による Hb 小胞体の可溶化

C₁₂E₁₀ 溶液による Hb 小胞体の可溶化を濁度変化から観察したところ、0.1 vol% の添加にて顕著な濁度低下が認められ、2.0 vol% の添加で完全溶解に充分であると判断された (図 5)。

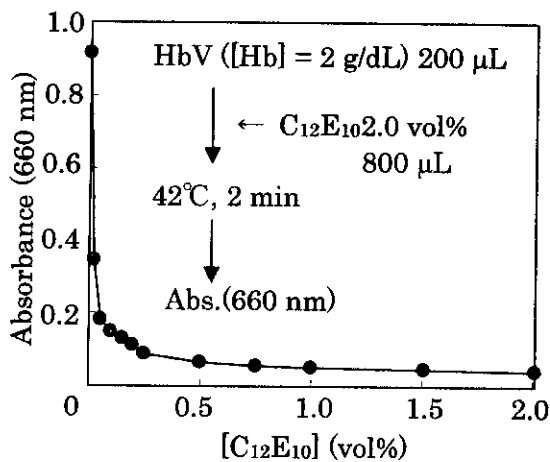


Fig. 5 The solubilization of HbV with $C_{12}E_{10}$ detected by the decrease in turbidity.

2) $C_{12}E_{10}$ 溶液濃度の影響

添加 $C_{12}E_{10}$ 溶液の濃度を変化させてゲル化時間を測定したところ、 $C_{12}E_{10}$ 溶液濃度の上昇と共にゲル化時間 (Tg) が長くなり、LPS 検出限界濃度が高く (すなわち感度が低く) なった (図 6、表 1)。

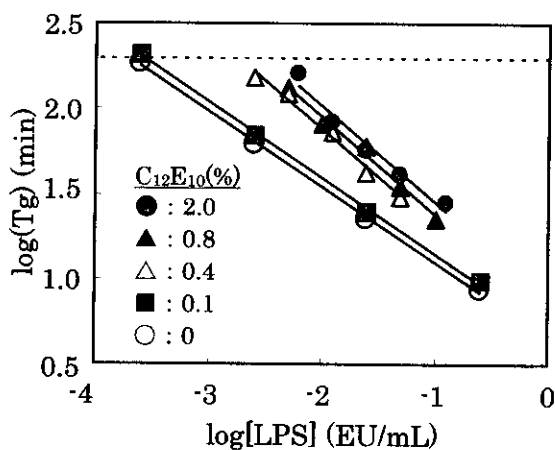


Fig. 6 The calibration curves for determination of [LPS] in the presence of $[C_{12}E_{10}]$.

Toxinometer の測定時間 (0 ~ 200 min) 内では、 $C_{12}E_{10}$ 溶液濃度 0.1 vol% にて最も低い LPS 濃度まで検出できた。さらに希釈しても、測定時間内に検出できずに検出感度の向上とはならなかった。したがって、本法における Hb 小胞体の LPS 検出限界濃度は、Hb 濃度 10 g/dL に換算して 0.1

EU/mL と決定された。

Table 1 The dissolution conditions of HbV and the detection limit of [LPS].

Dissolution condition		dilution factor	Final $[C_{12}E_{10}]$ (vol%)	Detection limit (EU/mL) ¹⁾
$[C_{12}E_{10}]$ (vol%)	HbV (g/dL)			
5	5	20	2.0	>0.23
2	2	50	0.8	>0.25
2	2	100	0.4	>0.25
2	2	400	0.1	>0.1

1) $[Hb] = 10$ g/dL 換算

3) LPS 回収率の測定

LPS-Vesicle (1.0 EU/mL) に $C_{12}E_{10}$ 溶液を添加してリムルス試験を行ったところ、ほぼ 100% の回収率が得られたが、 $C_{12}E_{10}$ 溶液を添加しない系では 0.6 EU/mL となり、回収率は 60% であった (表 2)。従って、LPS がリン脂質二分子膜小胞体に導入されているため、 $C_{12}E_{10}$ 溶液による小胞体可溶化の前処理が不可欠であった。

Table 2 The comparison of recovery of LPS with $C_{12}E_{10}$ and without $C_{12}E_{10}$.

Sample	[LPS] (EU/mL)	Recovery (%)
LPS-Vesicle + $C_{12}E_{10}$	1.03	103
LPS-Vesicle	0.60	60.0

LPS 回収試験の結果では (表 3)、各試料とも回収率が $100 \pm 25\%$ の範囲であった。FDA ガイドラインでは、検量線作成に用いた最小濃度の 4 倍量の回収率が $100 \pm 50\%$ 以内の時に試料の影響の無しと見なしており、本法はそれを満足していた (表 3)。また、Hb 溶液においては界面活性剤を加える必要はなく、低濃度 (0.001 EU/mL) まで回収できた。

Table 3 Inhibition/enhancement testing to monitor the recovery of spiked LPS in samples.

Sample	Spiked LPS (EU/mL)	Recovery (%)
Hb ¹⁾	1	97
	0.1	124
	0.01	101
	0.004	104±4.4 ²⁾
	0.001	121
Vesicle ³⁾	10	120
	5	103
	2.5	116
	1.25	92
	0.4	109±4.6 ²⁾
HbV ⁴⁾	10	112
	1	114
	0.4	111±3.7 ²⁾
	0.1	107
HbV ^{4, 5)}	0.1	103±21 ²⁾
	0.01	101±21 ²⁾
	0.001	117±6.5 ²⁾

¹⁾ [Hb] = 2 g/dL, ²⁾ n=3, ³⁾ [Lipid] = 1.2 g/dL,

⁴⁾ [Hb] = 10 g/dL, ⁵⁾ Pyrosep method

4) パイロセップ法による HbV の LPS 定量

LPS は、パイロセップのヒスチジン基に対してイオン性かつ疎水性相互作用によって特異的に吸着する。図 7 の結果から、パイロセップ法により作成した検量線は広い濃度範囲で高い直線性が得られ、かつゲル化時間が短いため短時間で測定が完了する。また、パイロセップ法による Hb 小胞体の回収試験の結果 (表 3)、LPS は試料や C₁₂E₁₀ の影響を受けることなく、100±25%の範囲内の回収率で回収できた。これは、パイロセップが LPS を特異的に吸着・濃縮することに加え、ゲルの洗浄によって夾雑物質(試料や C₁₂E₁₀ など)を除去できたためと考えられる。

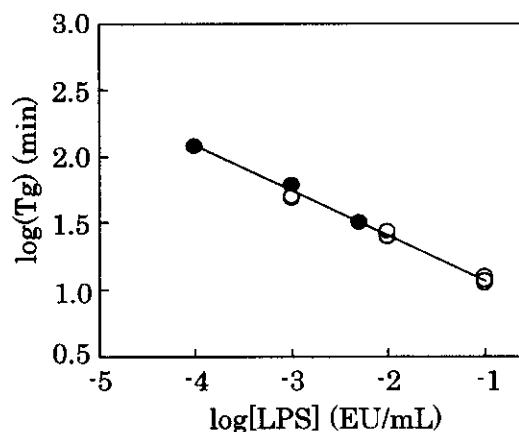


Fig. 7 The calibration curve for the determination of [LPS] and the plots for inhibition/enhancement testing by Pyrosep method.

5) 陽性荷電フィルターによる LPS 除去

20 g/dL の Hb 溶液ではフィルター透過前に 1.2 EU/mL の LPS が、200 mL 透過後まで 0.03 EU/mL が保持されていた。これは、陽性荷電を有するフィルターに陰性荷電を有する LPS が捕捉されたためと考えられる。処理効率は約 16 mL/cm² 以上であり、市販の Charged Durapore Filter カートリッジタイプ (膜面積 2.07 m²) により、20 g/dL の Hb 溶液を約 300 L 処理できる。

D. 結論

界面活性剤 C₁₂E₁₀ でリン脂質二分子膜小胞体を可溶化させることにより、Hb 小胞体の LPS 定量が可能となった。Hb 溶液、混合脂質、Hb 小胞体の添加回収試験において 100±25%の回収率が得られたことから、LPS 定量法の妥当性が確認できた。パイロセップ法により LPS をカラムに吸着させた後、試料や C₁₂E₁₀ を洗浄除去することで、LPS を高感度 (0.001 EU/ml) かつ高回収率で測定できた。陽性荷電のフィルターにより、Hb 溶液から陰性荷電の LPS を効率よく除去する効果を認めた。

3. カタラーゼによるメトヘモグロビン生成抑制

A. 目的

血中投与されたHb小胞体のメト化促進因子として、二分子膜透過性の過酸化水素 (H_2O_2) に着目し、 H_2O_2 消去能を有するカタラーゼを内包したHb小胞体の *in vivo* 投与試験を行ない、メト化抑制効果を検討した。

B. 方法

1) Hb 試料と活性酸素種 ($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2) の反応

ヘム濃度 $12 \mu M$ のHb溶液またはHb小胞体分散液 (pH 7.4、33 mM リン酸緩衝液) に、 $37^\circ C$ にてヒポキサンチン(Hyp)/キサンチンオキシターゼ(XOD)系より $O_2^{\cdot-}$ を $0.03 \mu M/s$ 、あるいは $0.09 \mu M/s$ となるように発生させてHb試料と反応、2分間隔で可視吸収スペクトルの連続測定を行った。

また、ヘム濃度 $12 \mu M$ のHb小胞体分散液 (pH 7.4、33 mM リン酸緩衝液) に、 $37^\circ C$ にて H_2O_2 を $12 \mu M$ 、 $120 \mu M$ になるように添加して反応させ、2分間隔で可視吸収スペクトルの連続測定を行った。

2) カタラーゼの精製と活性測定

カタラーゼ (ウシ肝臓由来) と Triton X-114 との混合溶液を曇点 $25^\circ C$ に昇温して相分離させた。水相を回収し、遠心分離 (5000 rpm 、20 min) した後、透析 (12 h) にて Triton X-114 を除去した。リムルス試験にてエンドトキシンを定量した。

カタラーゼ溶液 (ウシ肝臓由来) を振とうし ($37^\circ C$)、経時的に採取した後、カタラーゼ活性を測定した。カタラーゼ活性は、カタラーゼ溶液を 30% H_2O_2 溶液と混合し、 H_2O_2 の吸光度 (240 nm) が 0.45 から 0.40 ($3.45 \mu mol$ の H_2O_2 に相当) へ変化する時間を測定した。1分間に $1 \mu mol$ の H_2O_2 を消去するカタラーゼ量を 1 unit とし、カタラーゼ活性を算出した。

3) Hb 小胞体のメト化率測定

i) *in vitro* 試験： 酸素分圧 40 Torr、 $37^\circ C$ にて、2 wt% Hb 小胞体分散液 (pH 7.4、33 mM リン酸緩衝液) を振とう後、経時的に採取し、metHb (405 nm)、

deoxyHb (430 nm) の吸光度比からメト化率を算出した。

ii) *in vivo* 試験： Wister系ラット (体重約 200g) にHb小胞体 (Hb濃度 2.0 g/kg) を投与した後、経時的に採血し、遠心分離 (12000 rpm 、5 min) して得たHb小胞体のメト化率を metHb (405 nm)、deoxyHb (430 nm) の吸光度比から算出した。

C. 結果および考察

1) Hb 試料と活性酸素種 ($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2) の反応

Hyp/XOD系にて $0.03 \mu M/s$ 、 $0.09 \mu M/s$ の速度で発生させた $O_2^{\cdot-}$ はそれぞれ $0.2 \text{ \%}/\text{min}$ 、 $0.3 \text{ \%}/\text{min}$ の速さでHbをメト化した (図 8, ●, ○)。他方、Hb小胞体では、外水相で発生させた $O_2^{\cdot-}$ は二分子膜を透過できず、小胞体内のHbと反応しないことを確認した (図 8, △)。

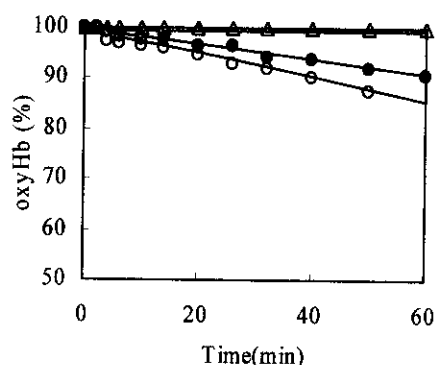


Fig. 8 Reaction of $O_2^{\cdot-}$ with Hb or HbV ([heme]= $12 \mu M$). ●: Hb + $O_2^{\cdot-}$ $0.03 \mu M/s$, ○: Hb + $O_2^{\cdot-}$ $0.09 \mu M/s$, △: HbV + $O_2^{\cdot-}$ $0.09 \mu M/s$

ヘムに対し等倍あるいは10倍の H_2O_2 をHb小胞体の外水相に添加したところ、20min以内に100%までメト化が進行したのに対し (図 9, ▲, △)、カタラーゼを内包したHb小胞体ではメト化の進行が大幅に抑えられた (図 9, ●, ○)。従って、外水相で発生する活性酸素種のうち、Hb小胞体のメト化に参与するものは主に H_2O_2 であり、カタラーゼの内包によりHb小胞体のメト化が抑制できると考えられた。

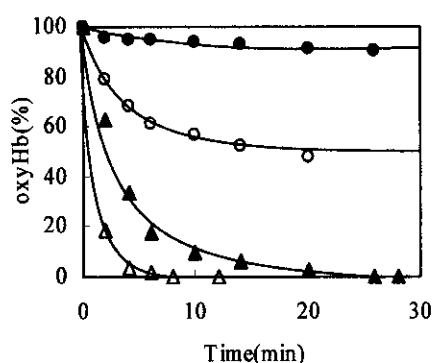


Fig. 9 Reaction of H_2O_2 with Hb or HbV ([heme]= $12\mu M$). ●: HbV encapsulating catalase + H_2O_2 $12\mu M$, ○: HbV encapsulating catalase + H_2O_2 $120\mu M$, ▲: HbV + H_2O_2 $12\mu M$, △: HbV + H_2O_2 $120\mu M$

3) 精製カタラーゼの活性度

カタラーゼからエンドトキシンを除去するために、 2.5×10^4 unit/mL カタラーゼ溶液 ([LPS] > 1 EU/mL) に Triton X-114 を混合し 25°C に昇温すると、二相に分離し、カタラーゼは水相へ移動することを確認した。水相を回収しエンドトキシンを定量したところ 0.038 EU/mL であった (表 4)。エンドトキシンは脂溶性のため、Triton X-114 の有機相に抽出されたものと考えられる。

Table 4 LPS removal of catalase by Triton X-114

Catalase activity (unit/mL)	unpurified (EU/mL)	purified (EU/mL)
2.5×10^4	> 1	0.038

37°C に於けるカタラーゼ活性の経時変化では、48 時間後も 90% の活性を維持し、ほとんど低下しなかった (図 10)。Hb 小胞体に内包したカタラーゼも同様の安定度を有するものと予測される。

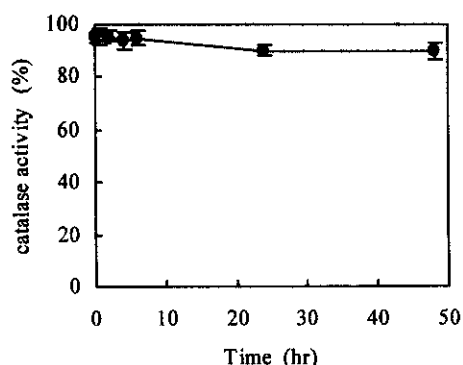


Fig. 10 The change of catalase activity with time at 37 °C.

3) Hb 小胞体のメト化抑制

酸素分圧 40 Torr (混合静脈血に相当) におけるメト化速度は、Hb 小胞体 1 では Hb 小胞体 2 よりも P_{50} が低いため (表 5)、3.3 %/hr から 2.3 %/hr に減少した (図 11, ○, ●)。

Table 5 Characteristics of HbV samples

HbV	1	2	3	4
P_{50} (Torr)	15	30	30	30
Catalase (10^4 unit/mL)	0	0	5	6

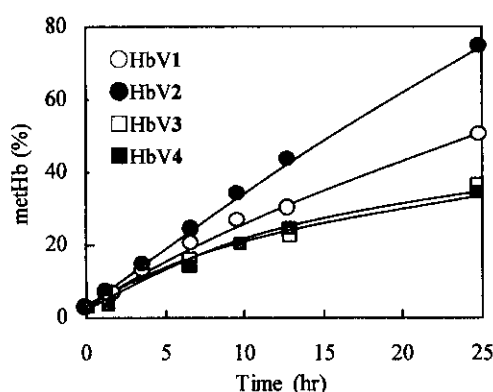


Fig. 11 Time course of metHb percentage in HbV *in vitro*, 40Torr of oxygen partial pressure.

Hb 小胞体 1 にカタラーゼを内包させたところ、Hb 小胞体 3 では 1.4 %/hr、Hb 小胞体 4 では 1.3 %/hr となり、Hb 小胞体 1 の 3.3 %/hr に比べ 42 % まで低下した (図 11, □, ■)。また、Hb 小胞体 3 と Hb 小胞体 4 ではメト化速度に差は見られなかったため、ヘムより発生した $O_2^{-\bullet}$ の不均化反応で生成した H_2O_2 は、 5.0×10^4 unit/mL のカタラーゼの内包により消去でき、 H_2O_2 によるメト化が抑えられた。*in vivo* 試験で用いた試料を表 6 に示す。

Table 6 Characteristics of HbV samples

HbV	1	2	3	4	5	6	7
P_{50} (Torr)	30	15	30	30	30	30	30
Catalase (10^4 unit/mL)	-	-	1	3	6	15	20
Hcy (mM)	5	-	-	-	-	-	-

酸素親和度 (P_{50}) 15 Torr の Hb 小胞体 2 (図 12,

●、メト化半減期 14hr)、あるいはカタラーゼ内包 Hb 小胞体群 (図 12, △, ▲, □, ■, ▨) では、従来型であるホモシステイン(Hcy)を内包した Hb 小胞体 1 (図 12, ○、メト化半減期 11.5hr) に比べ、メト化の進行が抑制された。また、カタラーゼを 1.0×10^4 、 3.0×10^4 、 6.0×10^4 、 1.5×10^5 あるいは 2.0×10^5 unit/mL 内包した Hb 小胞体 3~7 では、メト化率 50%になるまでの時間はそれぞれ 18 hr、21.5 hr、29 hr、38 hr、38.5 hr となり、従来型の Hb 小胞体 1 と比較してそれぞれ 1.6 倍、1.9 倍、2.5 倍、3.3 倍、3.4 倍メト化の進行を遅延できた (図 13)。

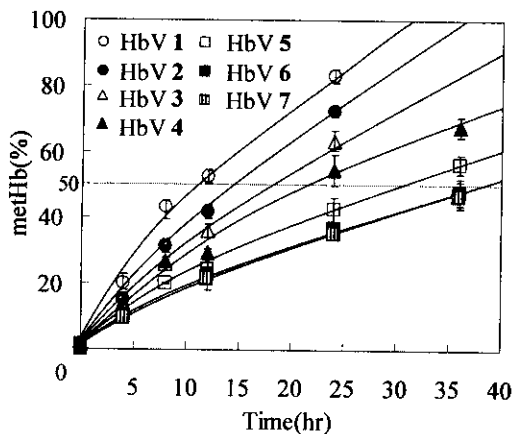


Fig. 12 Time course of metHb% in HbV *in vivo*.

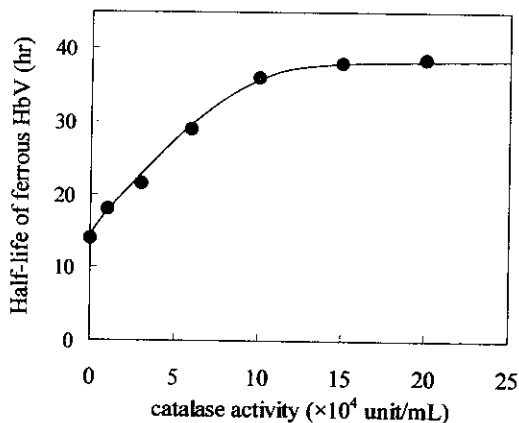


Fig. 13 Relationship between catalase activity and half-life of ferrous HbV oxidation *in vivo*.

in vivo では、ヘム由来の H_2O_2 の他に、生体内で発生している H_2O_2 が二分子膜を透過して小胞体内の Hb をメト化すると考えられるため、 H_2O_2 によ

るメト化を抑えるために、*in vitro* よりも過剰量のカタラーゼを内包する必要がある。カタラーゼを内包することにより、メト化半減期を 38.5hr まで延長でき、 H_2O_2 の消去が Hb 小胞体のメト化の抑制に有効であることが明らかとなった。

D. 結論

Hb 小胞体では、外水相で発生した $O_2^{\cdot -}$ は二分子膜を透過できないため、メト化に関する活性酸素種は主に H_2O_2 であることを確認した。カタラーゼ内包 Hb 小胞体の *in vitro* 試験では、 H_2O_2 消去によりメト化速度の抑制が認められた。Hb 小胞体で内包 Hb の自動酸化で生成した H_2O_2 は、 5.0×10^4 unit/ml の内包カタラーゼにより完全消去できた。ラット *in vivo* におけるカタラーゼ内包 Hb 小胞体のメト化の進行は、カタラーゼ未内包系の 3 倍以上の 38.5 hr まで遅延できた。

4. 放射化ラベルを利用した Hb 小胞体の体内動態評価

A. 目的

同位元素で標識した Hb 小胞体の投与を非侵襲下で観測し、その体内分布や動態に関する知見を与えることを目的とした。

B. 方法

1) 放射化標識法

放射性同位元素 sodium [technetium-99m] pertechnetate ($^{99m}TcO_4$; 半減期 6 hr) の生理食塩水溶液を hexamethylpropyleneamine oxime (HMPAO) の凍結乾燥体に添加した後、Hb 小胞体分散液と混合した。静置型培養機で 1 時間放置後、遊離 $^{99m}TcO_4$ をゲル濾過除去して標識を完了させた。

2) 体内動態の計測

^{99m}Tc -Hb 小胞体 ([Hb] : 9.5 g/dL) を Male,

Sparague-Dawley Rat の尾大静脈から投与 (1mL/min)、血液量(56mL/kg b.wt.として換算)に対して 15vol% (n : 3)および 25vol% (n : 5)投与群について比較した。Hb および脂質の投与量は各々 0.80g/kg b.wt.、0.53g/kg b.wt と 1.33g/kg b.wt.、0.88g/kg b.wt と算出された。また、標準として Hb を内包していない小胞体を使用した。^{99m}Tc-Hb 小胞体を投与直後から経時的に血液サンプルを採取(50μL)、シンチレーションカウンタで放射線計測し、投与直後を 100%として各時間での Hb 小胞体の残存率を算出した。

また ^{99m}Tc-Hb 小胞体を投与したラット全身における放射線の分布をγカメラで計測し(1~20分積算)、解析ソフトウェア(Medasy, Ann Arbor, MI)で放射線の体内分布を画像に変換して各臓器の位置を特定した。全身の放射線計数に対する各臓器に分布した放射線計数の比から分布率を算出した。投与 45 時間後まで血液採取とγカメラ計測を行った後、全身の臓器を採取し、各臓器中の放射線計数を計測した。投与試料の放射線計数を 100%として各臓器への Hb 小胞体の分布率を算出した。

C. 結果および考察

1) Hb 小胞体の放射化標識法と安定度

Hb 小胞体の規格と物性を変化させることなく、^{99m}Tc で放射化標識の確立が可能であった。本法は既に調製した Hb 小胞体を用いることができ、煩雑な操作を必要とせず、短時間で完了する。ラベル化率は 50%程度、*in vivo*での検出に十分な放射線強度が得られる。^{99m}Tc は臨床応用が認可されており、小胞体制剤の臨床第一相試験では、^{99m}Tc 固定による標識利用の体内動態評価が行われる例が多い。Hb 小胞体の規格を変えることなく、簡便法が適応できたことは、目前の臨床試験を見据えた観点からも重要な成果である。^{99m}Tc-Hb 小胞体をラット血漿と混合し、静置型培養機で所定時間放置すると僅かに ^{99m}Tc の漏出を認めるが、体内動態評価は充分可能な安定度を満足した。

2) Hb 小胞体の血中半減期

15vol%、25vol%投与群共に、Hb 小胞体の血中からの消失挙動は 2 相系であり、これは細網内皮系への取込みと続く飽和後の取込み機構によると推定された (図 14)。

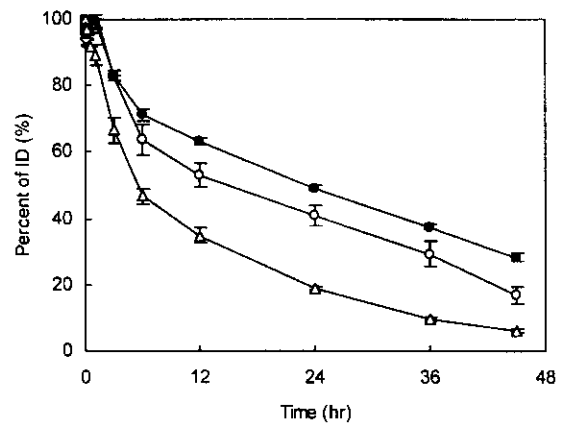


Fig. 14 Circulation presence of ^{99m}Tc-HbV and ^{99m}Tc-V as determined by scintillation counting of blood samples. Open circles; 15% ^{99m}Tc-HbV group (n=3), closed circles; 25% ^{99m}Tc-HbV group (n=5), and open triangle; 15% ^{99m}Tc-V group (n=3).

投与後 6 時間までの消失速度は比較的早く、細網内皮系への取込みと考えられ、それ以後は飽和により取込み速度は 1/3 に低下。現在の Hb 小胞体の規格での 15vol%、25vol%までの投与で血中半減期は各々 15 時間および 24 時間と算出された。また Hb を内包しない小胞体の 15vol%投与群では血中半減期は 6 時間であることから、高濃度 Hb (40g/dL) を内包させた Hb 小胞体では、内包 Hb が貪食細胞の飽和に関与して血中半減期が延長されることが明らかになった。

3) Hb 小胞体の体内分布

γカメラ計測では、投与 Hb 小胞体は先ず心臓および肝臓に強く検出された。これは心臓および肝臓の血液プールによるものであり、血流中を循環していることがわかる。時間の経過に伴い、心臓の放射線強度が減少し、肝臓および脾臓へと分布が変化した (図 15)。画像解析の結果、肝臓へ取り込みは投与 6 時間後に飽和に達し、25%投与群に比較して 15%投与群の方が高い値を示した。また、

脾臓への取り込みは 12 時間後に飽和に達し、取り込み割合は投与量に影響されない (図 16)。他方、Hb を内包していない小胞体では肝臓への取り込みに有意な差は認めないが、脾臓への取り込みが著しく上昇した。これにより血中半減期が短縮したものと考えられる。



Fig. 15 The statistic gamma camera images of whole body of rats injected $^{99m}\text{Tc-HbV}$ at (left) 10 minutes and (right) 24 hours after injection.

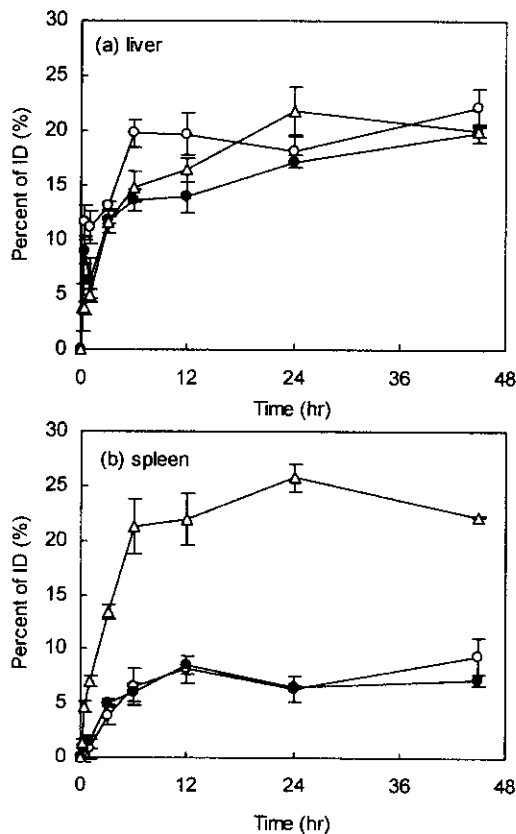


Fig. 16 The percentage of injection dose (% ID) calculated from the gamma camera image at various time points with decay correction. (a) liver and (b) spleen. Open circles; 15% $^{99m}\text{Tc-HbV}$ group (n=3), closed circles; 25% 15% group (n=3).

$^{99m}\text{Tc-HbV}$ group (n=5), and open triangle; 15% $^{99m}\text{Tc-V}$ 投与後 45 時間の Hb 小胞体の体内分布では、Hb 小胞体の投与量によらず主に肝臓、骨髄、脾臓に分布した (表 7)。これらの臓器はいずれも貪食細胞が分布しており、Hb 小胞体は貪食作用を経て代謝系へ誘導され、尿および便として排泄されるものと考えられる。また、Hb を内包していない小胞体では脾臓への取り込みが著しく上昇することから、貪食された Hb 小胞体の内包 Hb の存在が脾臓での貪食作用を抑制しているものと考えられる。

Table 7 Biodistribution of $^{99m}\text{Tc-HbV}$ and $^{99m}\text{Tc-V}$ at 45 hrs post-injection as a percentage of the injection dose.

Organ	HbV 25% (%)	$^{99m}\text{Tc-HbV}$ (%)	15% V (%)
Blood	17.99 ± 1.09	12.48 ± 2.40	4.54 ± 0.31
Liver	19.18 ± 0.30	19.23 ± 0.44	22.25 ± 2.48
Bone marrow	9.91 ± 0.45	9.94 ± 0.68	10.74 ± 1.00
Spleen	6.02 ± 0.34	5.12 ± 0.54	20.59 ± 0.46
Bowel	4.84 ± 0.51	4.73 ± 0.32	4.09 ± 1.10
Skin	1.70 ± 0.10	1.69 ± 0.30	1.82 ± 0.68
Kidney	1.99 ± 0.06	2.30 ± 0.10	2.42 ± 0.25
Muscle	1.48 ± 0.09	1.63 ± 0.26	0.71 ± 0.01
Lung	0.81 ± 0.08	2.22 ± 0.46	0.41 ± 0.06
Heart	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Brain	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Testis	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.00
Feces	8.98 ± 0.38	10.78 ± 0.49	5.96 ± 0.90
Urine	14.94 ± 0.52	17.32 ± 0.19	11.13 ± 0.24

D. 結論

Hb 小胞体の血中半減期は用量依存を示し、25vol%の場合、24 時間であった。現在臨床試験が進められている小胞体制剤では、血中半減期はラットの 3 倍程度に相当すると言われている。Hb 小胞体を酸素輸液として使用する場合、投与量が多量なため細網内皮系の飽和効果で血中滞留時間が延長されているものの、15~25vol%投与での血中半減期は、臨床試験では 2~3 日に換算される。Hb 小胞体は肝臓、脾臓、骨髄での貪食作用により血中から消失する。

5. 出血性ショックおよび Hb 小胞体投与後の皮下 微少循環動態の観測

A. 目的

ハムスター背部皮下微少循環動態を無麻酔条件で観測できる実験系を用い、出血性ショック時に Hb を投与したときの蘇生効果を全身動態および微少循環動態の回復から評価することを目的とした。

B. 方法

1) 無麻酔非侵襲微小循環動態観測手法の構築

微小循環動態を非侵襲・無麻酔により直接観測する方法 (Consious hamster dorsal skinfold model, Intaglietta 教授 (UCSD)らが開発) を利用した。Syrian golden hamster (体重約 60g, ♂) の背部皮膚に直径 1cm の硝子窓を取出し、侵襲の影響を無くす為に 4 日間以上の経過後、頸動静脈に挿管し、これを頸部皮下経路で背部より取り出し固定した。実験は覚醒翌日に実施し、頸動脈より採血と血圧測定、頸静脈より試料投与を行った。CCD カメラ搭載倒立型顕微鏡にて得られた画像から、1) 抵抗血管径(Ao)は画像剪断法にて、2) 血管中央の赤血球速度はフォトダイオード-cross-correlation 法によって測定、3) 血管内、及び組織酸素分圧 pO_2 の測定(Ao, A₁, A₂, A₃, 間質, V_c, V_L, V_o) は、 燐光色素 (bovine albumin/Pd-meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrine 複合体)の燐光寿命の酸素分圧依存性を利用した。燐光はフォトマルにて検出、消光曲線を一次指数関数として外挿、Stern-Volmer 式から pO_2 を算出した。

2) 出血性ショックと Hb 小胞体の投与

ハムスターの循環血液量の 50% (35 mL/kg) を 10%/min の速度で頸動脈より脱血した。この時点で血圧はほぼ 40 mmHg になるが、autotransfusion により循環血液量が増大し血圧が上昇してくるので、更に少量の脱血を行い、血

圧を 40mmHg に 1 時間維持した。その後、蘇生液を投与し(35 mL/kg, 10%/min)、1 時間まで観測した。血圧、心拍数、血液ガス、微少循環動態の観測ポイントを、脱血前、脱血直後、投与前、投与直後、30 分後、1 時間後とした。

Hb 小胞体 (Hb 濃度 10g/dL) は生理食塩水に分散されているので、25%HSA と混合して、Hb 濃度 7.6 g/dL または 3.8 g/dL, 外水相 HSA 濃度 8g/dL とした。比較群として、HSA 単独および脱血液を使用した。

C. 結果および考察

循環血液量の 50% (約 2.1 mL) を脱血後、更に約 0.65 mL を追加脱血させることにより、血圧は 40 mmHg に 1 時間維持できた(図 17)。蘇生液を投与するとどの場合も直ちに血圧の回復が見られるが、HSA 群は有意に低い値を推移した。Hb 小胞体/HSA 群は、脱血液と同等に回復が見られた。心拍数は脱血後に低下するが、投与後に HSA 群を除き全てが回復傾向にあった。

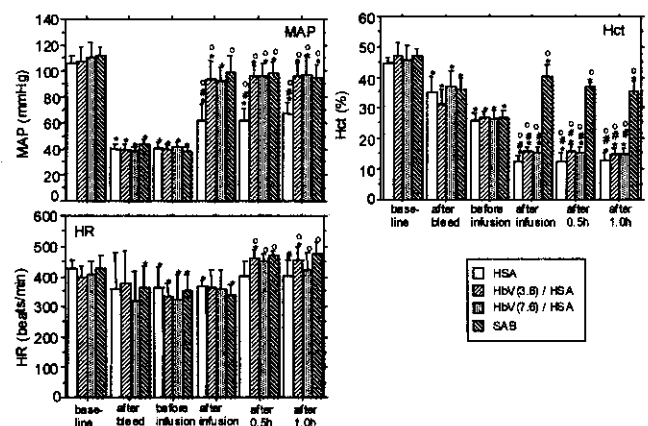


Fig. 17 Changes in mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and hematocrit (Hct) during hemorrhagic shock and resuscitation with infusion of HbV(3.8)/HSA, HbV(7.6)/HSA, HSA, and SAB. * significantly different from baseline ($p < 0.05$), # significantly different from the SAB group ($p < 0.05$). †: significantly different from "before infusion" ($p < 0.05$).

出血性ショックにより過呼吸となり、 PaO_2 の上昇と共に $PaCO_2$ の低下、塩基余剰(BE)と pH の顕著な低下が見られた(図 18)。Hb 小胞体/HSA およ

び脱血液の投与後は、過呼吸は低減されたが、HSA群のみ PaO₂ が高値を推移した。BE も HSA 群が最低値を示した。

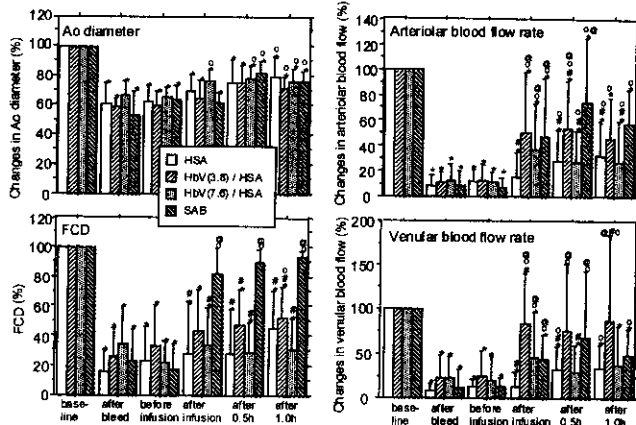


Fig. 18 Changes in blood gas parameters during hemorrhagic shock and resuscitation with infusion of HbV(3.8)/HSA, HbV(7.6)/HSA, HSA, and SAB. *: significantly different from baseline ($p < 0.05$), #: significantly different between the indicated groups ($p < 0.05$). †: significantly different from “before infusion” ($p < 0.05$).

微小循環動態の観測の結果、内径が約 150 μ m の抵抗血管径は出血ショックにより初期値の 60%まで顕著な低下を示し、それに伴い下流域の著しい血流低下(初期値の 20%以下)が見られた(図 19)。

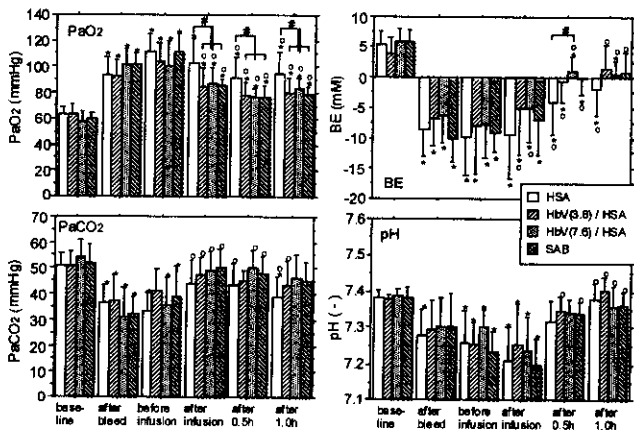


Fig. 19 Changes in Ao diameter, arteriolar and venular blood flow rates, and FCD during hemorrhagic shock and resuscitation with infusion of HbV(3.8)/HSA, HbV(7.6)/HSA, HSA, and SAB. *: significantly different from baseline ($p < 0.05$), #: significantly different from the SABgroup ($p < 0.05$). †: significantly different from “before infusion” ($p < 0.05$). @: significantly different from HSA group ($p < 0.05$).

蘇生液を投与すると血管径は回復傾向にあるが不完全であり、結果として血流にも完全な回復は見られなかった。これはショック状態の生理反応として血管収縮により全身の血流分布を脳や心臓などの重要臓器に集中させる(centralization)効果によるものと考えられる。血流および有効毛細管密度の回復は Hb 小胞体/HSA 群では特に Hb 濃度が 3.8 g/dL の時が 7.6 g/dL の場合よりも優れ、HSA 単独よりも有意に高値を推移する傾向が明らかとなった。微小循環系の酸素分圧を測定したところ、Hb 小胞体/HSA 群では HSA 群より優れていた(図 20)。しかし脱血液の投与と比較すると有意に低い値に留まった。

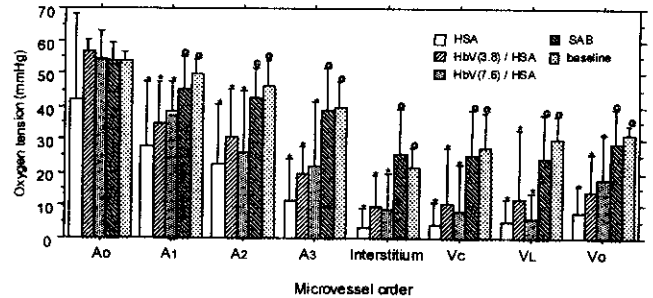


Fig. 20 Microvascular and interstitial O₂ tensions one hour after resuscitation from hemorrhagic shock with infusion of HbV(3.8)/HSA, HbV(7.6)/HSA, HSA, and SAB. * significantly different from the baseline ($p < 0.05$), ‡ significantly different from the HSA group ($p < 0.05$).

D. 結論

Hb 小胞体/HSA による蘇生では Hb 濃度に依らず、血圧、心拍数、血液ガス組成は正常値に戻る傾向を示し、HSA 単独投与よりも回復の度合いが良好であった。微小循環動態は、Hb 濃度 3.8g/dLの方が 7.6 g/dL の場合よりも微小循環動態が改善される傾向が認められた。この理由としては、先ず(a) 3.8g/dL の Hb 小胞体投与後でも総 Hb 濃度は 7g/dL 以上が維持されているので、十分に蘇生しうる条件にあること。(b) Hb 小胞体は血漿相に分散し、血管壁と直接接触するので、血管壁、及び組織への酸素供給が迅速であり、低濃度でも十分であること。また、(c) Hb 小胞体は血漿相に分