

図 8. A 型物質競合 EIA における標準曲線。精製グリコホリン A を標準物質として PBS/0.05% スキムミルク (○) あるいは B 型溶血液 (◇) で系列希釈し、標準曲線を得た。A : OD450 に対しプロット、B : logit 変換してプロット。

A、B、O、AB 型溶血液を用い特異性を検討したところ、A 型、AB 型溶血液では競合反応がみられるのに対し、B 型、O 型溶血液ではみられなかった (図 9)。同時再現性は 24.9%、日差再現性は 10.1%であった。

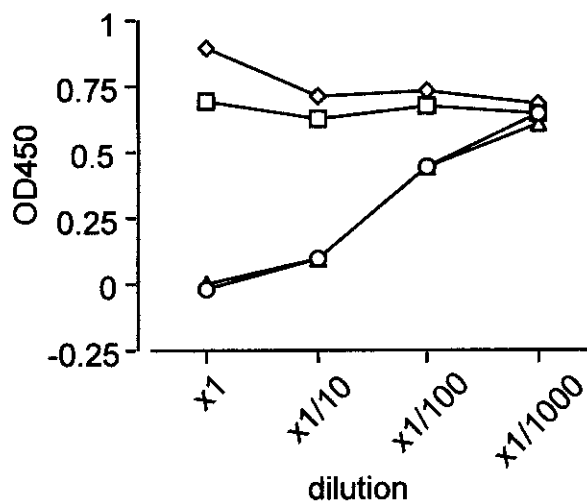


図 9. A 型物質競合 EIA の特異性。各血液型溶血液を用い、競合反応がみられるか検討した。○ : A 型、◇ : B 型、□ : O 型、△ : AB 型。

D. 考察

A 型赤血球から精製したグリコホリン A を用いて A 型物質定量法を確立できた。B 型溶血液を用いた検討から、高濃度 Hb 存在下においても十分な検出感度が得られることが分かった。同時再現性の改善が課題となるが、蛍光基質を用いるなどして、更なる高感度化も可能となろう。今後、ヘモグロビン溶液の品質管理に有用な方法であると考えられた。

4. アルブミン・ヘムがヒト血清補体および血小板に及ぼす影響 (予備検討)

A. 研究目的

ヘモグロビンを用いる酸素運搬体はその原料としてヒト赤血球を必要とするのに対し、ヒト赤血球に依存しない酸素運搬体としてアルブミン-ヘム (rHSA-Heme) が開発されている。rHSA-Heme は化学合成したヘムを遺伝子組み替えヒトアルブミンに包接したもので、酸素運搬能を有することが証明されている。今回、生体適合性の観点から、ヒト補体系、血小板に対する影響について検討した。

B. 研究方法

rHSA-Heme 溶液 (5%アルブミン) をヒト血清あるいはヒト血漿と 10%, 20%, 40%v/v で混合し、37°C、1 時間反応を行った。その反応液の補体価 CH50 および補体活性化反応の最終産物 SC5b-9 を測定した。

rHSA-Heme のヒト血小板活性化に対する影響を血小板の α 顆粒に存在する接着分子 P-selectin (CD62P) の発現と血小板上の膜糖蛋白 (α IIb β 3) の構造変化を認識する血小板活性化マーカー、PAC-1 の発現を指標にして検討した。全血 (クエン酸三ナトリウム加) と rHSA-Heme を 10, 20, 40% (v/v) で混合し、37°C、10 分間反応を行った。Hepes Tyrode's buffer (pH 7.3) で血小板濃度を $4 \times 10^5/20 \mu\text{l}$ に調整した後、FITC 標識抗 PAC-1、PE 標識抗 CD62、PerCP 標識抗 CD42a と ADP (最終濃度 0.05, 0.1, 0.5, 5, 10 μM) を添加した。室温、暗所で 20 分間反応後、1%パラホルムアルデヒドを添加して固定した。固定後 PBS で 1 回洗浄し、PBS に再浮遊してフローサイトメトリーにて測定した。

C. 研究結果

血清補体価 CH50 は希釈率に応じて減少したが、rHSA よりも rHSA-Heme で更に低下する傾向にあった (図 10)。補体系活性化により生成する SC5b-9 は、何も添加していないコントロールより高値となる場合があったが、統計的有意差は見られなかった (図 11)。また希釈率に応じた SC5b-9 値の変化も乏しい傾向にあった。

rHSA-Heme が PAC-1 発現に及ぼす影響は、ADP 刺激および未刺激のいずれにおいてもみられなかった (図 12)。rHSA は ADP 刺激下において PAC-1 の発現を抑制する傾向がみられた。CD62P 発現に関しても、rHSA-Heme は ADP 刺激および未刺激のいずれにおいても影響を及ぼさなかった (図 13)。rHSA 40%と血小板とのインキュベーションにより、未刺激、ADP 刺激 0.05 および 0.1 μM

において CD62P 発現の有意な増加がみられた。

D. 考察

rHSA-Heme により補体価 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。また rHSA-Heme は血小板を単独では活性化せず、また ADP 刺激による活性化にも影響を及ぼさないと考えられた。しかし対象として用いたヘムを包接する前の rHSA では PAC-1 および CD62P 発現に影響を及ぼした。この要因として、rHSA 製剤に含まれる安定化剤 (カプリン酸ナトリウム、アセチルトリプトファン) の関与が疑われた。この安定化剤はヘム包接過程で除かれ、rHSA-Heme には含まれていないからである。安定化剤の影響など、今後の検討を要する。

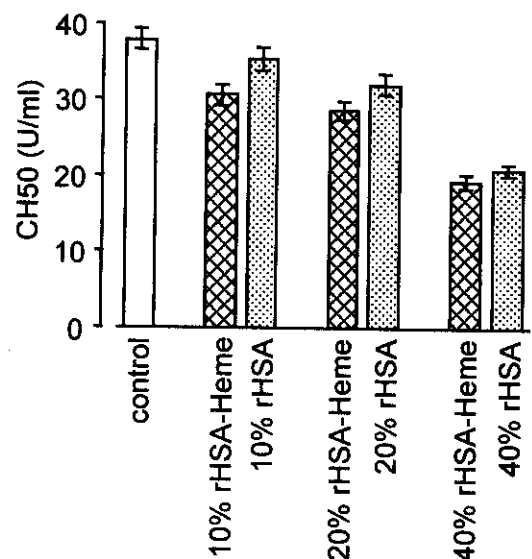


図 10. rHSA-Heme がヒト血清補体に及ぼす影響。rHSA-Heme あるいは rHSA を血清と混合後、37°C、1 時間反応を行った。反応溶液中の補体価を測定した (n = 5, mean \pm SEM)。

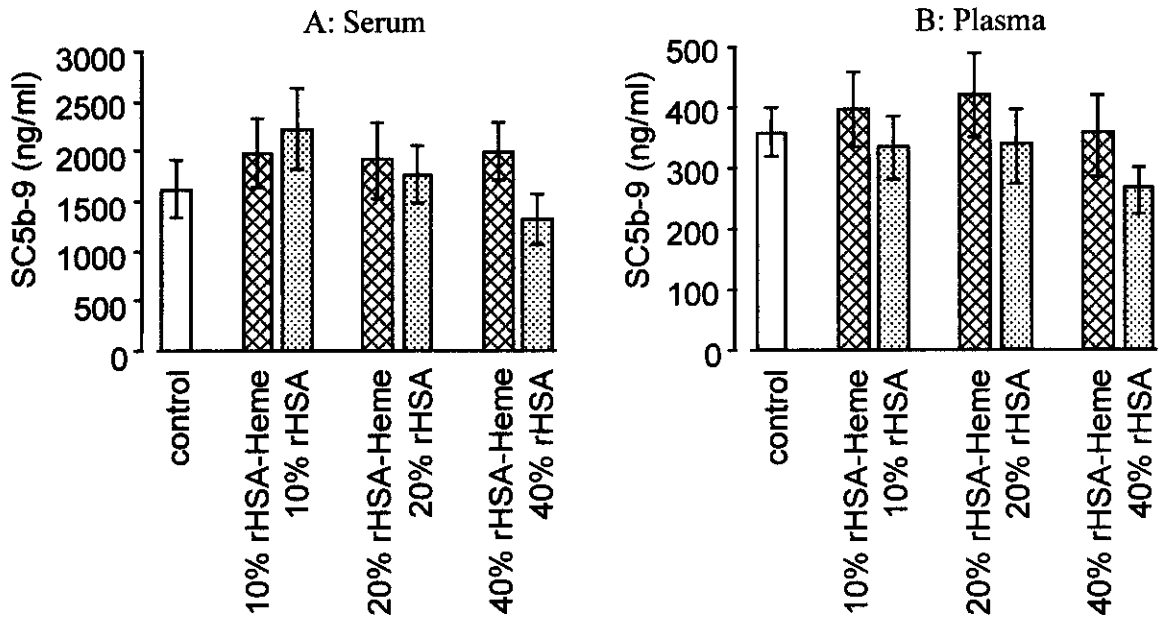


図 11. rHSA-Heme がヒト血清および血漿補体に及ぼす影響。 rHSA-Heme あるいは rHSA を血清あるいは血漿と混合後、37°C、1 時間反応を行った。反応溶液中の terminal complement complex (SC5b-9) を測定した (n = 5, mean ± SEM)。

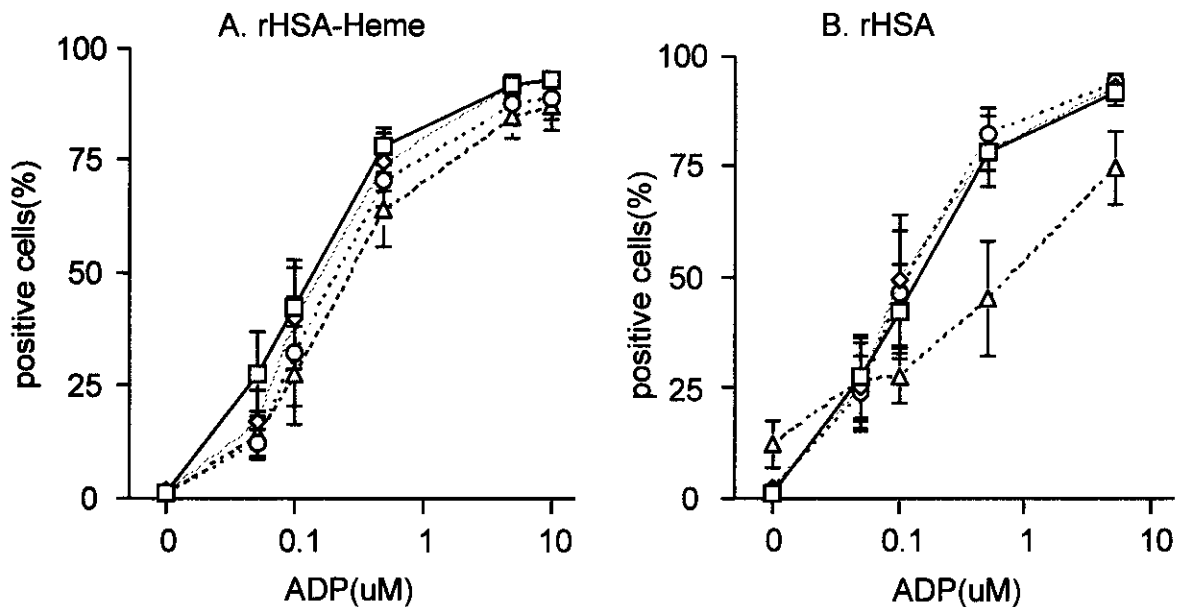


図 12. rHSA-Heme がヒト血小板 PAC-1 発現に及ぼす影響。 rHSA-Heme あるいは rHSA を全血と混合後、37°C、10 分間反応を行った。FITC 標識抗 PAC-1 および ADP との反応の後、フローサイトメトリーにて PAC-1 発現量を測定した。□ : PBS、◇ : 10%、○ : 20%、△ : 40% (n = 3, mean ± SEM)。

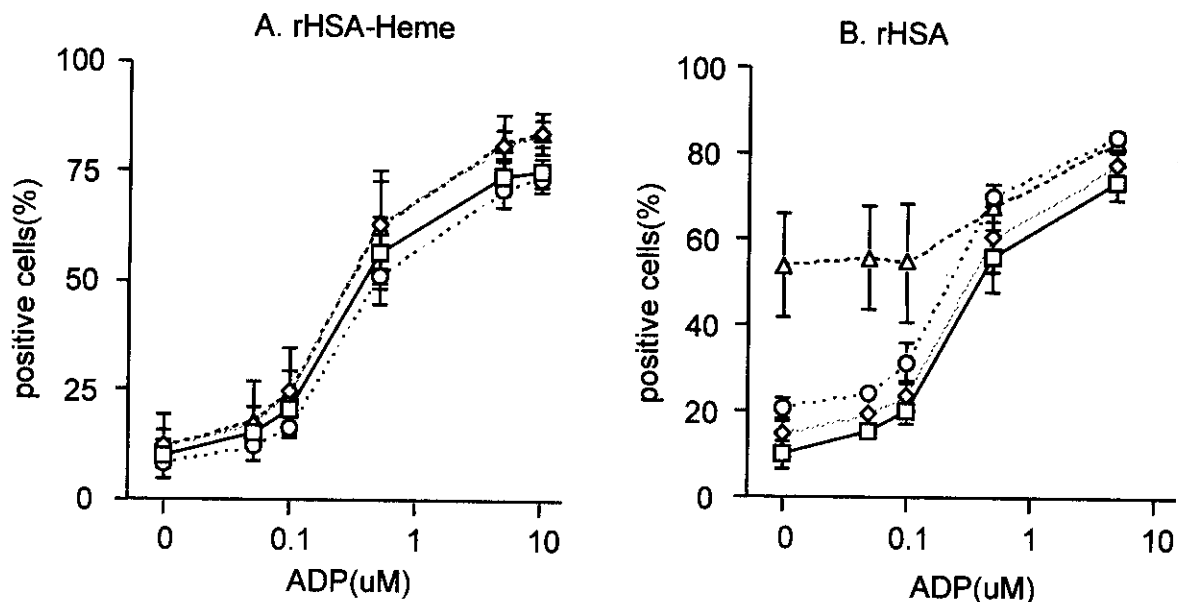


図 13. rHSA-Heme がヒト血小板 p-selectin (CD62P) 発現に及ぼす影響。rHSA-Heme あるいは rHSA を全血と混合後、37°C、10 分間反応を行った。PE 標識抗 CD62 および ADP との反応の後、フローサイトメトリーにて PAC-1 発現量を測定した。□ : PBS、◇ : 10%、○ : 20%、△ : 40% (n = 3, mean ± SEM)。

5. 研究業績

A. 論文発表

- Huang Y, Takeoka S, Sakai H, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H, Tsuchida E.: Complete deoxygenation from a hemoglobin solution by an electrochemical method and heat treatment for virus inactivation. *Biotechnol Prog.*, 2002 **18**:101-107.
- Naito Y, Fukutomi I, Masada Y, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H.: Virus removal from hemoglobin solution using Planova Membrane. *J. Artif. Organs*, 2002 **5**:141-145.

B. 学会発表

- 阿部英樹, 他. ヘモグロビン小胞体が血漿凝固

及び血漿タンパク質に及ぼす影響. 第 9 回 日本血液代替物学会総会 9 月 4-5 日, 東京

- 阿部英樹, 他. ヘモグロビン小胞体がヒト補体に及ぼす影響. 第 40 回 日本人工臓器学会大会 10 月 2-4 日, 札幌
- 阿部英樹, 他. 人工的酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による *in vitro* 補体活性化. 第 46 回 日本輸血学会北海道支部会例会 11 月 2 日, 札幌
- Abe H, et al. Effects of hemoglobin vesicles on blood cells and complement in rat. The 9th International Symposium on Blood Substitutes 3 月 2-5 日, 東京

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. Hb 小胞体の単回投与後(20 mL/kg)の血液生化学検査
 2. Hb 小胞体の 40%血液交換試験
 3. Hb 小胞体による 50%出血ショック蘇生試験
 4. Hb 小胞体の反復投与試験と 2 週間生存
 5. Hb 小胞体投与が肺微少循環動態に及ぼす影響

分担研究者	小林 紘一	慶応義塾大学医学部外科	教授
研究協力者	堀之内 宏久	慶応義塾大学医学部外科	講師
	渡辺 真純	慶応義塾大学医学部外科	講師
	泉 陽太郎	慶応義塾大学医学部外科	講師
	山本 学	慶応義塾大学医学部外科	助手
	酒井 宏水	早稲田大学理工総研	講師

研究要旨

ヘモグロビン(Hb)小胞体の効能と安全度試験を、Wistar 系ラットを用いて実施した。(1) 先ず 20 mL/kg 単回投与後 7 日間の生存試験では、細網内皮系への Hb 小胞体の捕捉により投与 2 日後に肝脾の一過性肥大が認められたが、7 日後には正常値に戻った。採血液中の Hb 小胞体は超遠心分離により容易に血漿と分離でき、生化学的検査を正確に実施できた。肝機能や腎機能を反映するパラメータに異常は認められなかった。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。(2) Hb 小胞体で循環血液量の 40%を急速交換したところ、ヘマトクリットは 7 日で正常値に復した。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が、他に変動は見られなかった。(3) 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、血圧も血液ガス蘇生も直ちに回復し、脱血液の投与と同等であった。(4) 反復投与試験(10 mL/kg/day x 14 days)を実施したところ、前例生存し体重増加が持続した。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、14 日後には正常値に復した。(5) Hb 小胞体投与後の呼気中の内因性一酸化窒素濃度に変化が無いこと、右室圧と血管径も変動が軽微であることを確認した。

1. Hb 小胞体の単回投与後の血液生化学検査

A. 目的

これまでにラットを用い、Hb 小胞体(HbV)単回投与後 2 週間の食食能の推移をカーボンクリアランス法から、また肝脾における代謝過程を組織病理学的検討から明らかにした。しかし骨髄も異物代謝の主要臓器であり、この検討が要求されていた。また、血液生化学検査は、血漿中に混在する Hb 小胞体が阻害作用を示すため測定困難な項目が多かったが、Hb 小胞体粒子を超遠心分離すれば阻害作用を完全に消失できることを明らかにした。そこで、これ迄と同じ投与モデルを用い、以下の試験を行い、安全性に関する情報を得ることを目的とする。

B. 方法

Wistar 系ラット(♂、180-200g)エーテル麻酔下、Hb 小胞体(生理食塩水分散)を 20 ml/kg で尾静脈より単回投与して覚醒、生存させた。投与後 8hr, 1, 2, 3, 7 日後にセボフルレン麻酔下頸動脈に挿管し、血液 5 mL を採血した。ACD 溶液に希釈して血球数を測定(Sysmex)。また超遠心分離(50000g, 20 min)で得られた上清を血液生化学検査に提出した(BML 社)。

C. 結果および考察

Hb 小胞体を投与されたラットは全例が犠牲死させるまで生存した。血球数や Hct に著変なし。体重は投与後 2 日までは殆ど変化しなかったが、その後増加傾向を示した。体重に対する脾臓重量の比率の推移では、Hb 小胞体投与後に増大し、3 日後に初期値の二倍に増大したが、7 日後には低下(図 1)。Hb 小胞体捕捉と代謝消失による変化と考えられる。肝臓重量は顕著な差は認められなかった。

投与直後の血漿中 Hb 小胞体濃度は、6g/dL と算出される。8 時間後に 4.5 g/dL, 1 日後に 2 g/dL, 7 日後には消失していた。投与前の Hb 小胞体のメト

化率は 2%, 8 時間後に 26%, 24 時間後に 63%程度にまで上昇していた。

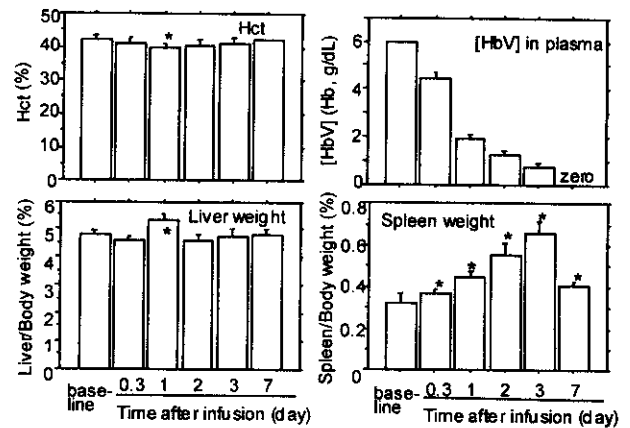


図 1. Hb 小胞体投与後のヘマトクリット、肝臓と脾臓の重量、および Hb 小胞体の濃度の推移。

血液生化学検査を実施したところ(図 2-4)、肝臓と脾臓で Hb 小胞体の捕捉代謝が盛んに行われるので、肝機能を反映する測定項目の変動が懸念されていた(図 2)。しかし ALT が 30 U/L から 8 時間後、1 日後に 40 U/L に僅かに上昇するだけで、肝機能の障害は認められなかった。

総コレステロールが増大しているが(図 3)、これは遊離コレステロールと HDL コレステロールの増大に起因し、Hb 小胞体から血漿に移動したものの、或いは一度食食されたものが遊離したと考えられる。また B リポ蛋白は初日に増大するが、徐々に低下した。リン脂質濃度も初日に増大する傾向を示すが、徐々に低下した。中性脂肪(TG)は顕著に低下した。遊離脂肪酸も初日に増大するが、直ぐに低下した。CRE の低下と UA の増大がみられたが、一過性であり、また正常値の範囲と判断された(図 4)。リパーゼは顕著に増大したものの、アミラーゼが殆ど変化しないので、膵臓の障害は無いと考えられた。

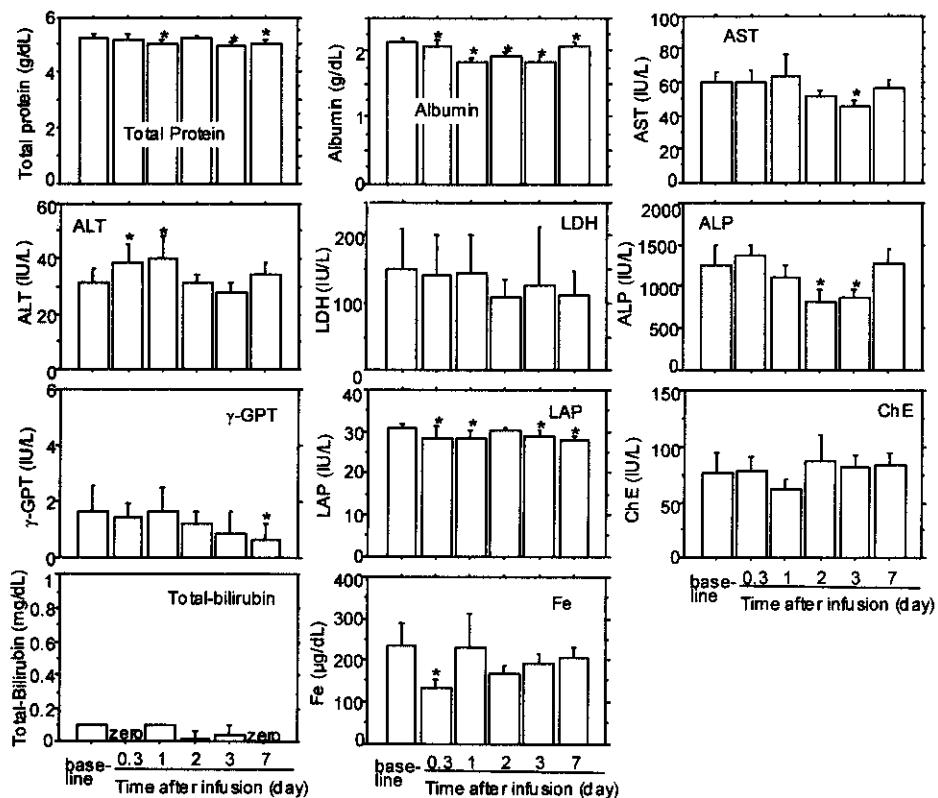


図 2. Hb 小胞体投与後(20 mL/kg)の血液生化学的検査の結果(1)

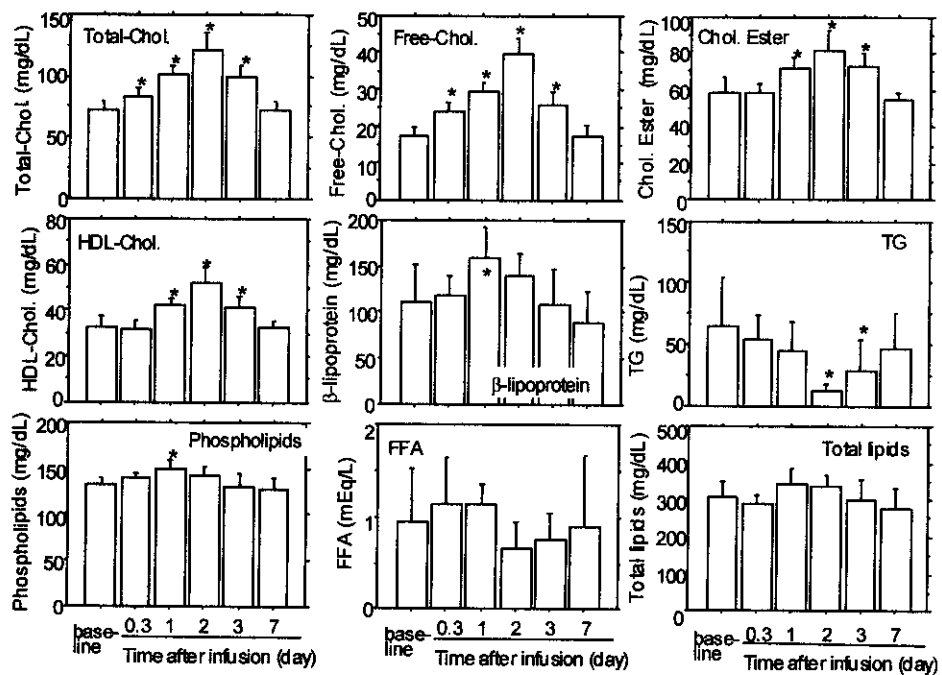


図 3. Hb 小胞体投与後(20ml/kg)の血液生化学的検査の結果(3)

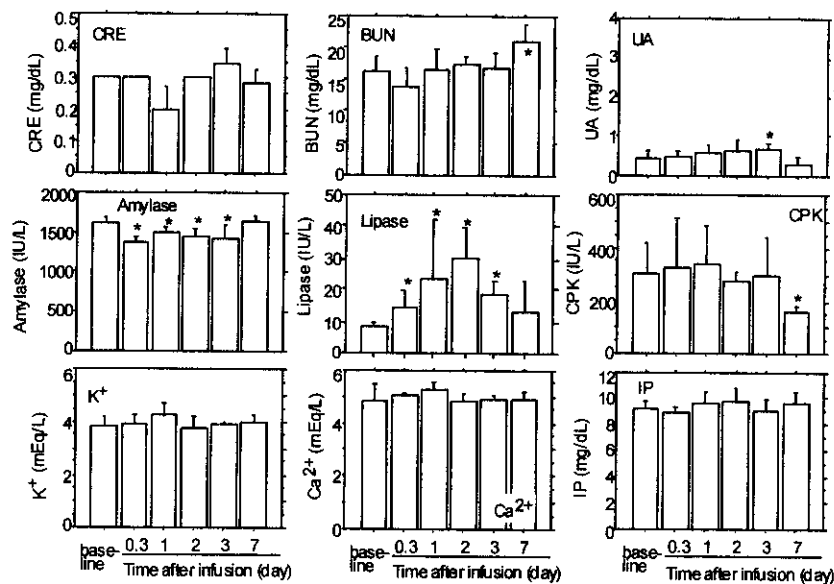


図 4. Hb 小胞体投与後(20 ml/kg)の血液生化学的検査の結果(2)

D. 結論

Hb 小胞体を投与したラットは全例が犠牲死させるまで全例が生存した。細網内皮系の一つである肝臓に Hb 小胞体が捕捉されることの影響を検討するため、肝機能を反映するパラメータを測定したが著変は認められなかった。リパーゼの上昇が見られたが、これは Hb 小胞体には多量の脂質成分が含まれるので、投与による代謝機能亢進の可能性がある。しかし修飾 Hb の投与で膵炎になり、リパーゼが上昇することが問題視されているので、更に詳細検討が必要がある。脂質成分特にコレステロール濃度に一過性上昇が見られるが、これは一度細網内皮系に捕捉された成分が放出されたものと考えられる。しかしこれも 7 日後には消失した。

2. Hb 小胞体の 40%血液交換試験

A. 目的

平成 13 年度ではラット全血の 40%を Hb 小胞体で交換輸血後 6 時間までの観測を行い、血液循環動態、血液生化学分析において問題となる著変項目は認められなかった。平成 14 年度は、交換輸血後の長期生存試験を行い、回復過程を観測すると共

に、組織病理学および血液生化学的検討により安全度の確認を実施した。

B. 方法

Wistar rat (約 230g, ♂, 50 匹)を用いた。ネブタール腹腔内麻酔下、頸動脈に挿管、全血量の 40%, 22.4 ml/kg (全血量を 56ml/kg として計算)を交換した。試料は、Hb 小胞体([Hb] = 10 g/dL)に 25% リコンビナントアルブミン(rHSA)を添加して膠質浸透圧を 20 mmHg に調節した Hb 小胞体/rHSA (n=25)、および HSA 単独 (n = 25) を用いた。投与後右頸動脈を結紮、縫合し覚醒させた。1, 3, 5, 7, 14 日後に 5 匹ずつ体重測定、Sevoflurane 麻酔下、左頸動脈に挿管し、血圧、心拍数、血液ガスを測定した。また、採血液を超遠心分離し、得られた血清の生化学的検査を実施した。腎、肝、脾、肺、骨髄を摘出し、組織病理学的検査を実施した(H/E, Berlin blue 染色)。

C. 結果および考察

40%血液交換されたラットは Hb 小胞体/rHSA 群、rHSA 群ともに全例が犠牲死されるまで生存した。Hct は交換前 $43.8 \pm 3.0\%$ であったが、交換後に $26.4 \pm 2.6\%$ に低下し、血液交換率は理論通りほぼ

40%となった(図5)。3日後には $31.8\pm 2.0\%$ に、7日後にはほぼ交換前の値($43.3\pm 1.3\%$)まで回復した。白血球数、血小板数も血液希釈のため低下するが赤血球と比較して軽微であった。これは体内プールからの放出のためと考えられる。3日後にはほぼ回復し、造血機能に問題が無いと考えられた。

体重は交換後1日後に僅かに低下したが、3日後には増加に転じ、14日後には20%増大した。脾臓重量/体重比は、3日後に約二倍に増大したが、7日後には低下傾向にあり、14日後には交換前と有意差が無く、正常値に回復した。興味深いことにrHSA単独で血液交換した後も脾臓重量の増大が見られた。ヒトアルブミンが異種蛋白として認識されたために、比較的早い時期に捕捉された可能性がある。血液ガス組成では1日後に呼吸性アルカローシスが認められたが、3日以降には回復していた。

血液生化学検査の結果(図6、7)、肝機能や腎機能を反映するパラメータに異常値を認めなかった。脾機能を反映するリパーゼの有意な上昇が認められたが、アミラーゼには異常値は認められなかった。Hb小胞体の投与に伴う脂質成分の大量投与に対して、代謝機能が亢進した可能性がある。

コレステロール成分が3日後に一過性に有意に増大したが、7日後には正常値に復した。ヘモグロビンのヘムがhemeoxygenaseにより分解されるときに放出すると考えられる鉄やビリルビン値に異常を認めなかったため、貪食細胞に捕捉された後すみやかに分解され、胆汁中にビリルビンが排泄されたこと、また胆汁管の鬱滞が無いことを示唆していると思われた。

病理組織学的検討では、3日後に脾臓、肝臓、骨髄に捕捉されたHb小胞体の像が認められたが、7日後には完全に消失していた。14日後にも肝臓と脾臓にはヘモジデリンが僅かに認められた。その他の臓器には著変は認められなかった。

D. 結論

Hb小胞体をリコンビナントアルブミンに分散させて、ラットの循環血液量の40%を交換したところ、ヘマトクリットは1週間ではほぼ正常値に復し、脾臓肥大も一過性であり、血液生化学的検査ではリパーゼとコレステロール成分の上昇が認められたのみであり、安全度に関する知見を集積することができた。リパーゼの上昇の原因については今後詳細を検討する必要がある。

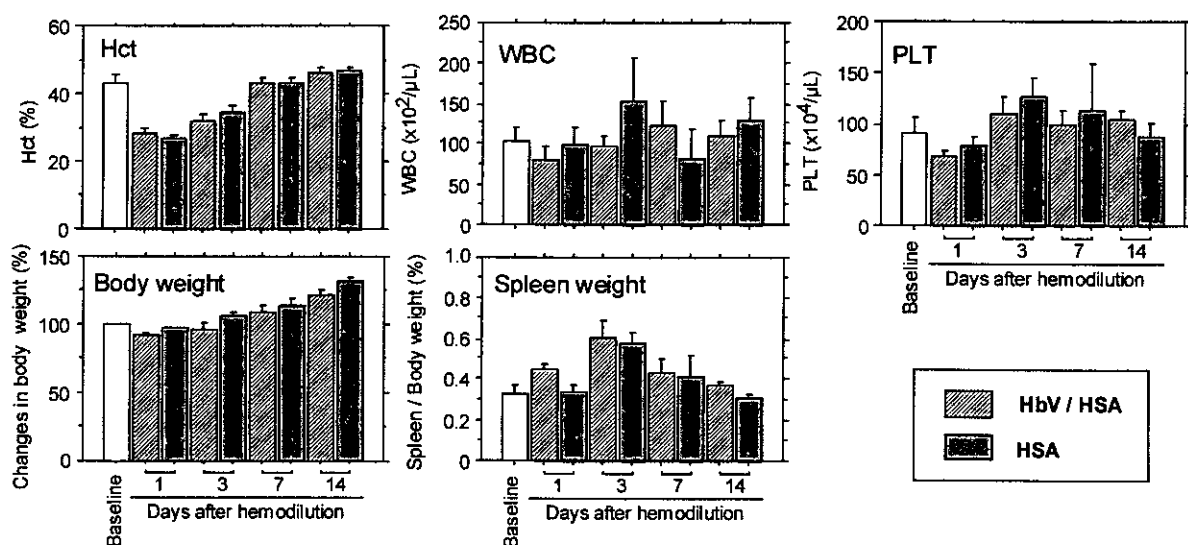


図5. Hb小胞体で40%血液交換した後の血球数と臓器重量の推移

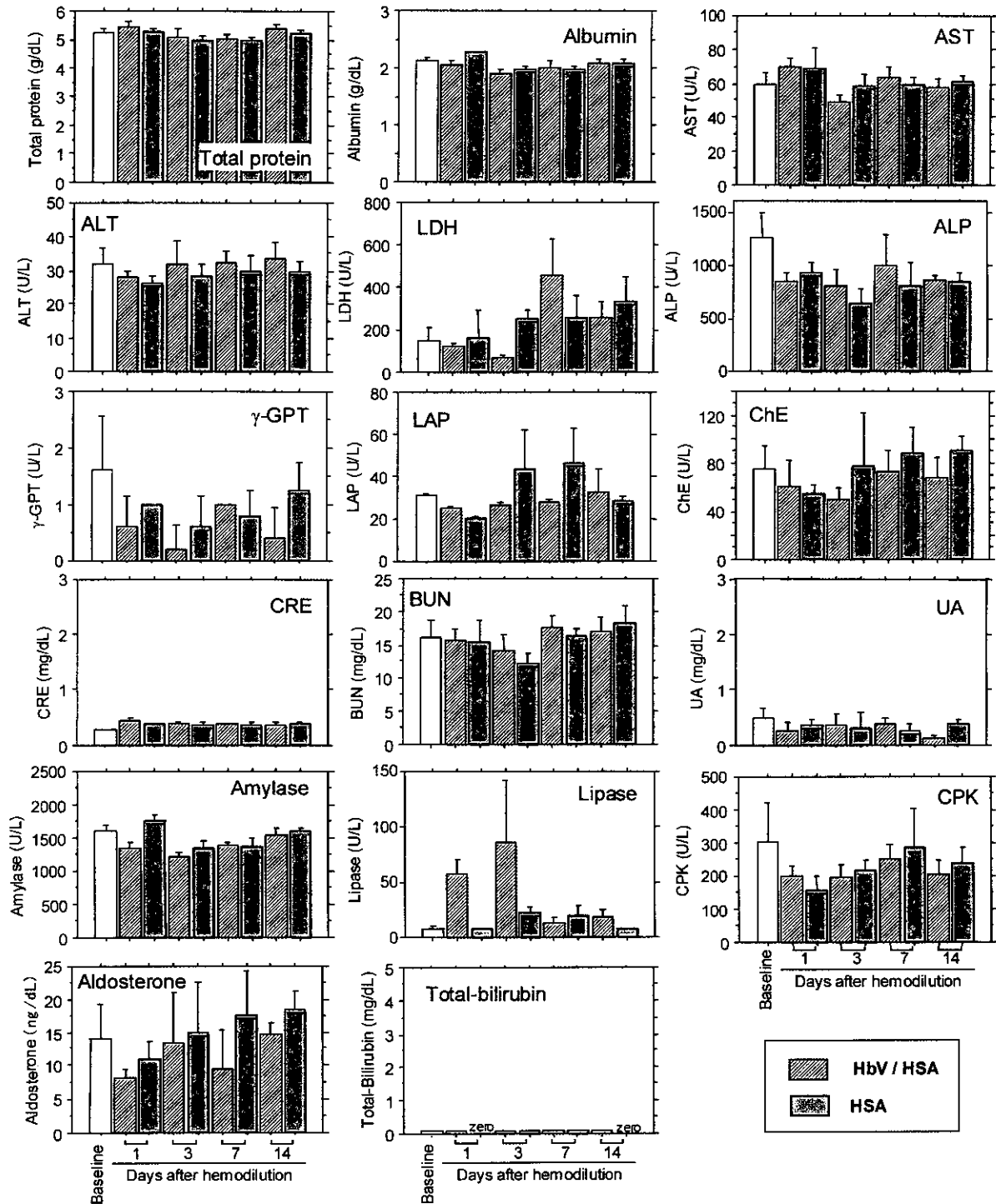


図 6. Hb 小胞体で 40%血液交換した後の血液生化学的検査 (1)

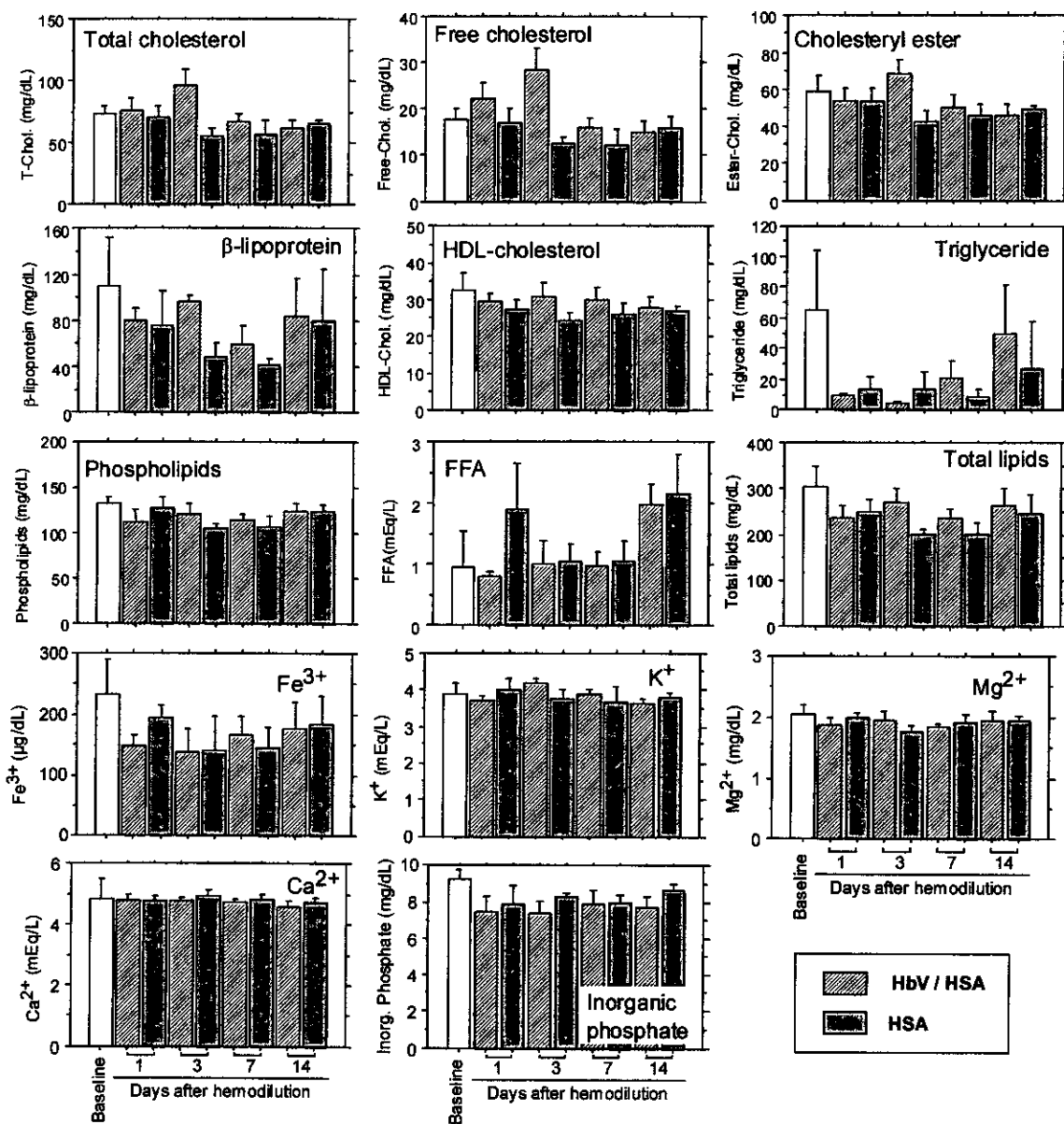


図7. Hb 小胞体で 40%血液交換した後の血液生化学的検査 (2)

3. Hb 小胞体による 50%出血ショックからの蘇生試験

A. 目的

出血ショックモデルラットに Hb 小胞体(HbV)を投与し、血圧や血液ガス組成などの測定から蘇生液としての機能を脱血液や洗浄赤血球と比較することを目的とした。

B. 方法

Wistar rat (約 250g, ♂)に sevoflurane(1.5%)麻酔下、自発呼吸。頸動脈、頸静脈に挿管し、頸動脈より脱血(全血液量は 56 mL/kg とすると、脱血量は 28mL/kg, 約 8.4 mL)。投与速度を 1mL/min とした。脱血後、15 分間放置し、試料を投与した。

投与試料は、Hb 小胞体と 25%リコンビナントアルブミン(rHSA)を混合した HbV/rHSA (HbV / 25% rHSA = 8.6 / 1.4 vol./vol., [Hb] = 8.6 g/dL, n = 8), 脱血した自己血 (SAB 群, Shed Autologous Blood, n = 8), rHSA 群(Human Serum Albumin, n = 8)および洗浄赤血球を rHSA に分散させ、Hb 濃度を 8.6 g/dL とした赤血球分散溶液 (RBC/rHSA, n = 8), および rHSA 単独を用いた。

測定ポイントは、脱血前、脱血後、投与直後、1 hr, 3 hr, および 6 hr (犠牲死)とした。測定項目は、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。犠牲死時、血液を 6mL 程度採取、採血管に入れて遠心分離し血球成分を除去した。血清を超遠心分離機にかけて Hb 小胞体を除去し、血液生化学的検査を実施。組織切片をホルマリン固定 (肝、脾、肺、心、腎、骨髄)、H/E 染色した。

C. 結果および考察

rHSA 群のみ 8 例中、2 例が 3 時間から 6 時間の間に死亡した。HbV/rHSA 投与群を含め他の群は全例生存した (図 8)。

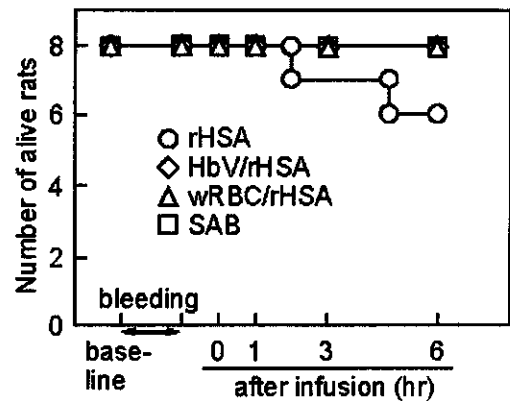


図 8. 出血性ショックラットに蘇生液を投与した後の生存率。

血圧(MAP)は、脱血前に 100mmHg 程度であったが、脱血後に 30 mmHg 程度にまで低下した。SAB 群は直後に 110mmHg にまで上昇したが、1 時間後に 90mmHg になり、そのまま 6 時間推移した。HSA 群は投与直後に 90mmHg に上昇したが、1 時間後に 74mmHg にまで低下した。生存したラットの 6 時間後の血圧は 71mmHg であり SAB 群に比較して有意に低い値であった。一方で HbV/rHSA 群は投与後に 98mmHg にまで回復、1 時間後には 93 mmHg になり、そのまま 6 時間後まで推移し、rHSA 群よりも有意に高い値であり、SAB 群と同等であった (図 9)。修飾 Hb を投与すると血圧亢進することが報告されているが、HbV/rHSA の投与ではそのような現象は認められなかった。心拍数、呼吸数、体温は全群において初期値をほぼ維持していた。ヘマトクリット(Hct)は、脱血前約 43%であるが、脱血後に約 35%に低下した。これは失血量を補うために体液が血管内に移行したため、血液が希釈されたことに起因する。SAB 群では投与後に 43%程度にまで回復した。一方、rHSA 群と SAB 群では、投与直後に血液が希釈されるため、約 20%に低下した。

血液ガス組成については、脱血後に代償機能により過呼吸のため PaO₂ の上昇、PaCO₂ の低下、pH の低下、BE の顕著な低下、また乳酸値の上昇が見られた (図 10)。

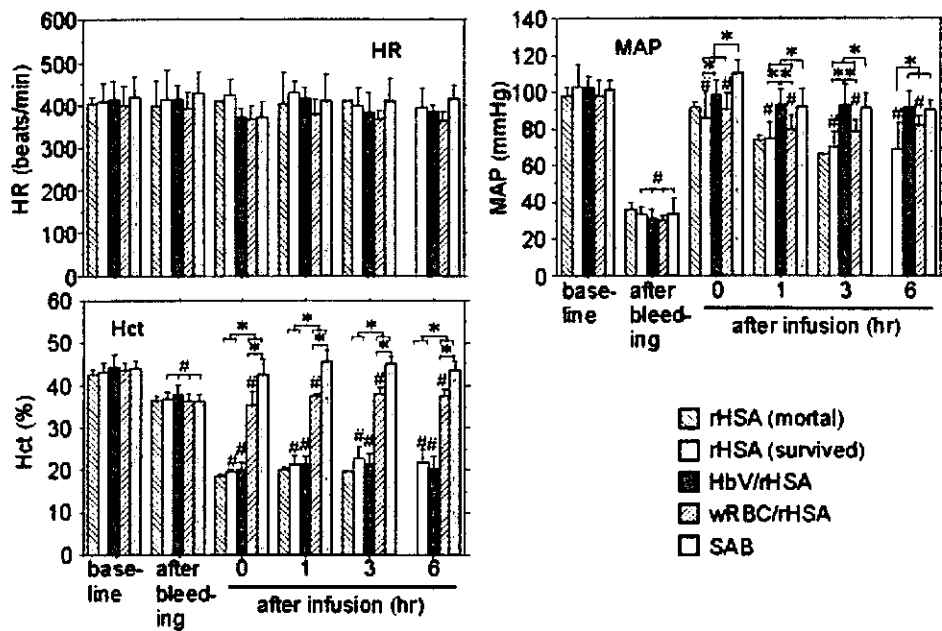


図9. 出血性ショックラットに蘇生液を投与した後の心拍数、血圧、ヘマトクリットの推移。# vs. baseline, * between the groups ($p < 0.05$)

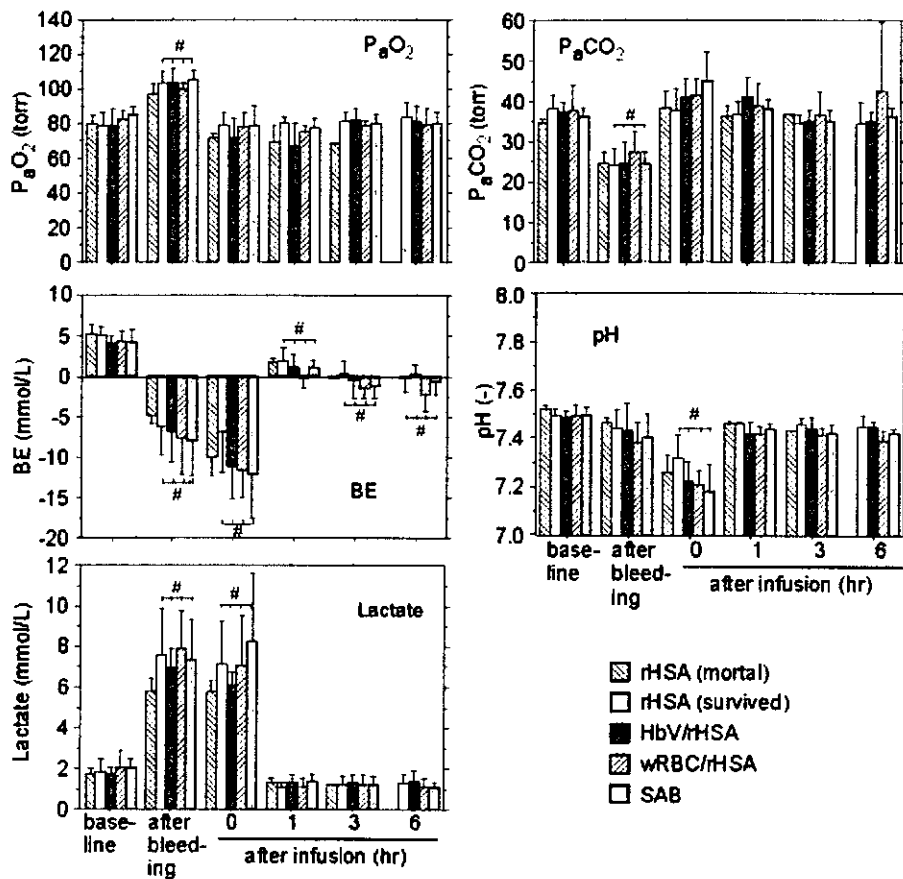


図10. 出血性ショックラットに蘇生液を投与した後の血液ガス組成の推移。# vs. baseline, * between the groups ($p < 0.05$)

投与直後に、全群において PaO₂、PaCO₂が初期値にまで回復した。BE と pH 値は投与直後に最低値を示した。また乳酸値も投与直後には回復しなかった。しかし pH と乳酸値は1時間後には初期値まで回復し、6時間まで推移した。BE は全群において回復したが、初期値より低い値を推移した。BE, pH, 乳酸値の回復の遅れは、投与直後に末梢微小循環が回復に向い、蓄積していた代謝産物が wash out されたために見られた現象と考えられる。全群ともに同様の傾向を示したが、rHSA 投与死亡群では、PaO₂が低めの値を推移した。従って、酸素運搬の低下による低血圧と、麻酔条件では呼吸に依る代償機能が不十分であったことが rHSA 投与群の死因と考えられる。

D. 結論

Hb 小胞体をリコンビナントアルブミンに分散させた溶液を出血性ショックに対する蘇生液として投与したところ、血圧、血液ガス組成も回復し全例生存した。脱血液の投与と同等の結果が得られたことから、Hb 小胞体が赤血球と同等の酸素運搬機能を有することが確認できた。

4. Hb 小胞体の反復投与試験と2週間生存

A. 目的

新薬の非臨床試験において安全度確認のための項目の一つに、GMP 基準で製造された試料について齧歯類およびその他の動物を対象とした3段階の投与量での反復投与試験が要求されている。そこで、予備的にラットに対して Hb 小胞体の反復投与試験(投与量 10 ml/kg/日を14日間投与)を実施し、体重と臓器重要の測定、血液学的、血液生化学的、組織病理学的検討、尿検査、凝固検査などから総合的に安全度を評価することを目的とした。

B. 方法

Wistar系ラット(約140g, ♂、(n = 12匹, 2群)

を用いた。Sevoflurene 麻酔下、Hb 小胞体(生理食塩水に分散, [Hb] = 10 g/dL)または生理食塩水を尾静脈よりサーフロー留置針(24G)を用いて毎朝 9:30~12:00 の間に投与した。投与量は、毎朝測定した個々の体重と 10 ml/kg/day から必要量を計算した。総量は 140 mL/kg となり、循環血液量の 2.5 倍に達する。

投与期間中の測定項目は、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。14 回目の投与が終了後、12 匹のうち 6 匹を翌日に犠牲死させた。残りの 6 匹は 2 週間後に犠牲死させた。Sevoflurene(1.5%)麻酔下、頸動脈に挿管し、血圧、心拍数、血液ガス、血球数、グルコース濃度を測定。次いで約 7mL の血液を急速採取し、血液生化学的検査、血液凝固検査、Hb 小胞体の分析(Hb 濃度)を行った。最後に腹部大動脈を切開し、放血死させた。

血液生化学的検査の項目としては、肝機能: ビリルビン、総蛋白、アルブミン、ChE, GOT, GPT, ALP, γ -GTP, LDH、腎機能: 非蛋白窒素、尿素窒素、クレアチニン、クレアチン、心筋: クレアチンキナーゼ、膵臓機能: アミラーゼ、リパーゼ、ヘム代謝: 血清鉄、直接、間接ビリルビン、総鉄結合能/不飽和鉄結合能、脂質代謝: リン脂質、コレステロール、脂肪酸、トリグリセリド、内分泌系: アルドステロン、体液緩衝機能: 各種電解質濃度。摘出臓器(腎、肝、脾、肺、骨髄、脳、脳下垂体、胃、小腸、副腎、筋、皮膚、膵臓など)は、ホルマリン固定後 パラフィン包埋、或いはグルタルアルデヒド固定後 凍結保存した。

病理染色法は、H/E, Berlin blue(ヘモシデリン)を実施した。今後更に抗ヒト Hb 抗体、ヘムオキシゲナーゼ(HO-1)抗体(GTS-3)、ビリルビン抗体を使用した免疫染色を実施する予定。

C. 結果および考察

Hb 小胞体の反復投与試験を実施したところ、ラットは全例生存した。体重は直線的に増大を続け

たが、生理食塩水投与群に比較すると増加率は低下していた。しかし反復投与終了7日後、14日後には両群に有意差は認められなかった(図11)。後述の肥大した肝臓と脾臓が胃を圧迫し食欲を低下、或いはHb小胞体投与は蛋白質と脂質を供給しているので食餌量が低下したことなどが原因として考えられる。血球数の測定では、ヘマトクリットおよび赤血球数の増加が抑制傾向にあった(図12)。これはHbVの血液中占有体積の増大(血漿中濃度5.2g/dL)による変動(図13)に起因すると考えられる。血小板数、白血球数は変動が見られるものの、正常値を推移したと考えられた。

第一日目投与直後、血漿中のHb小胞体濃度は3g/dLに増大したと考えられるが、2日後には1.3g/dLにまで低下しており、半減期は約22時間程度と考えられた(図13)。第二日目の投与直後では4.3g/dLになったと考えられるが、3日目にその減少は速くなっていることから、次第にHb小胞体の貪食機能が亢進していると考えられた。その後投与によるHb小胞体濃度の増大は抑制され、最終的に5.2g/dLにまで増大するが反復投与終了後、血中Hb小胞体は1週間以内に完全に消失していた。

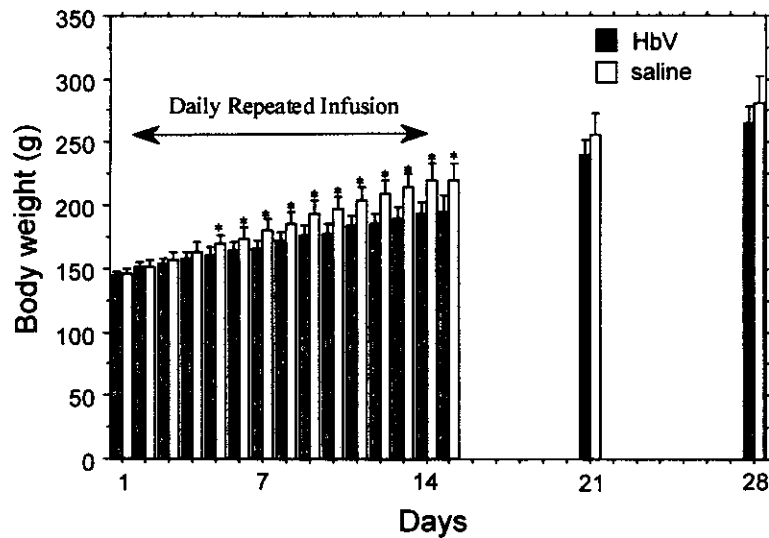
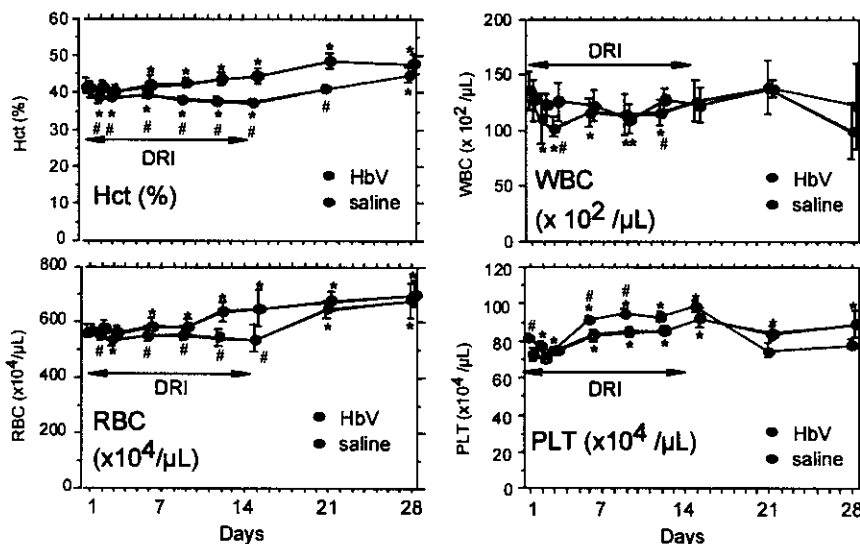


図11. Hb小胞体の反復投与期間中およびその後2週間の体重の推移, * $p < 0.05$.



* $p < 0.05$ vs. baseline, # $p < 0.05$ vs. saline group

図12. Hb小胞体の反復投与期間中およびその後2週間の血球の推移, * $p < 0.05$.

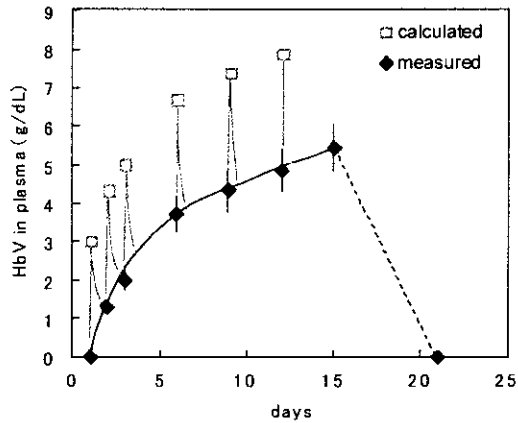


図 1 3. 血漿中の Hb 小胞体由来の Hb 濃度の推移。

犠牲死時の血液ガス組成には問題となる所見は認められなかった(表 1)。

表 1. Hb 小胞体反復投与翌日および二週間後の血液ガス組成、血圧、心拍数

parameters	1day after DRI	2 wks after DRI	control
pH	7.44 ± 0.03	7.43 ± 0.03	7.48 ± 0.30
PaCO ₂ (torr)	41 ± 3	44 ± 4	37 ± 4
PaO ₂ (torr)	76 ± 4	75 ± 7	82 ± 7
Lactate (mM)	0.93 ± 0.12	0.88 ± 0.38	1.59 ± 0.45
BE (mM)	3.1 ± 1.3	4.0 ± 0.8	4.5 ± 1.3
MAP (mmHg)	125 ± 4	111 ± 12	101 ± 8
HR (beats/min)	419 ± 10	402 ± 33	404 ± 42

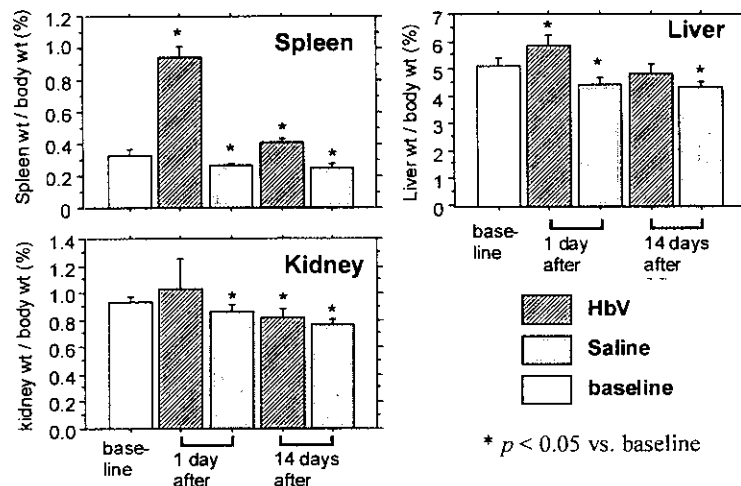


図 1 4. Hb 小胞体反復投与後翌日および 1 4 日経過後の肝臓、脾臓、腎臓の重量変化。

血液生化学的検査では、脂質成分の増大、特にコレステロール成分の増大が反復投与終了1日後に顕著であった(図 15, 16)。これは Hb 小胞体の膜成分に由来し、一度細網内皮系に捕捉された成分が血中に遊離したものと考えられる。しかし、14 日後には正常値に復した。肝機能や腎機能を反映するパラメータに異常は認められなかった。

しかし、膵臓の機能を反映するパラメータの一つであるリパーゼは有意な増大を示し、反復投与終了14日後でも高い値を示した。アミラーゼが増大しないこと、また組織病理学的検討からも膵臓に障害は無いと考えられるので、リパーゼ活性の増大は、多量の脂質投与により亢進されたものと考えられるが、今後詳細な検討が必要となる。

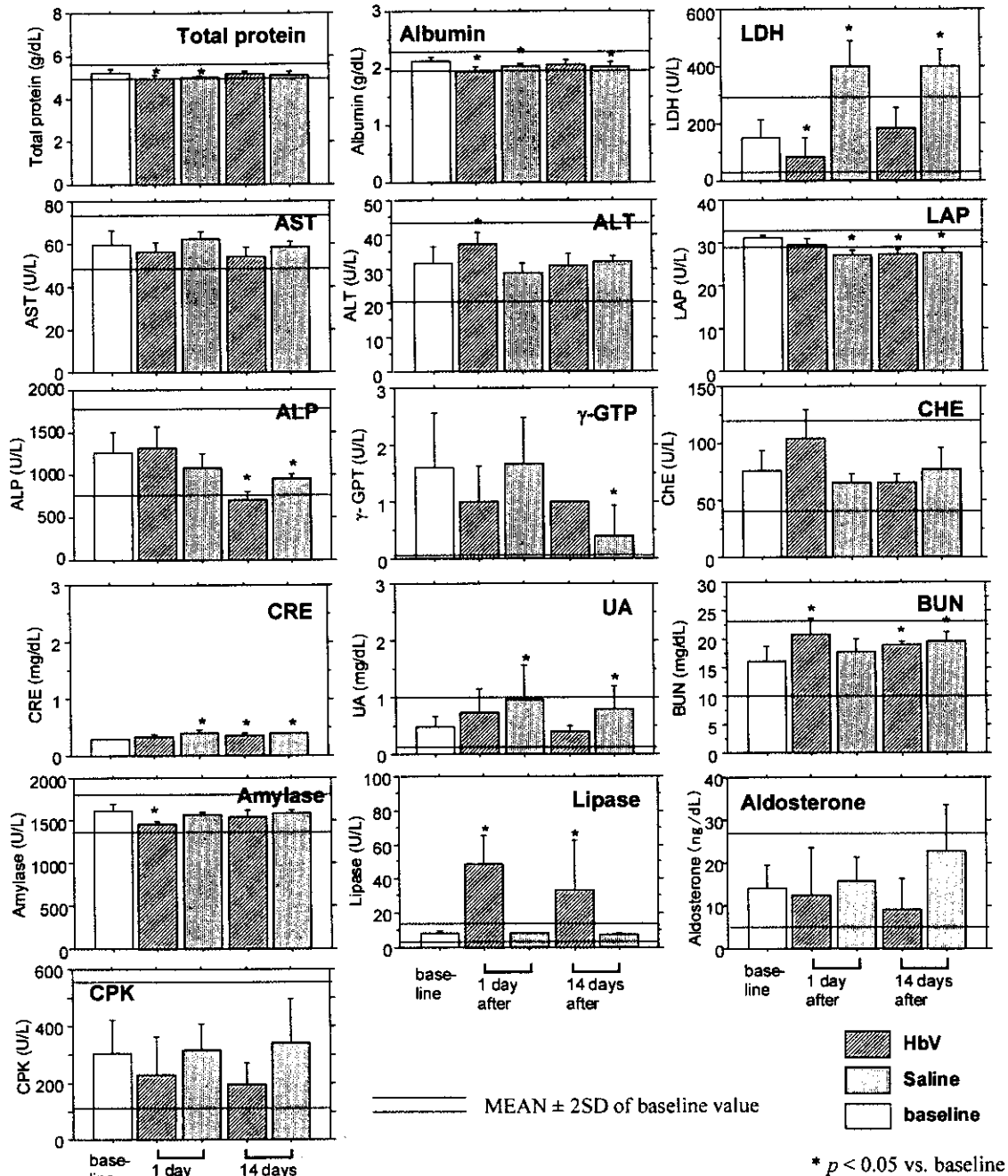


図 15. Hb 小胞体反復投与翌日および14日経過後の血液生化学的検査(1)。

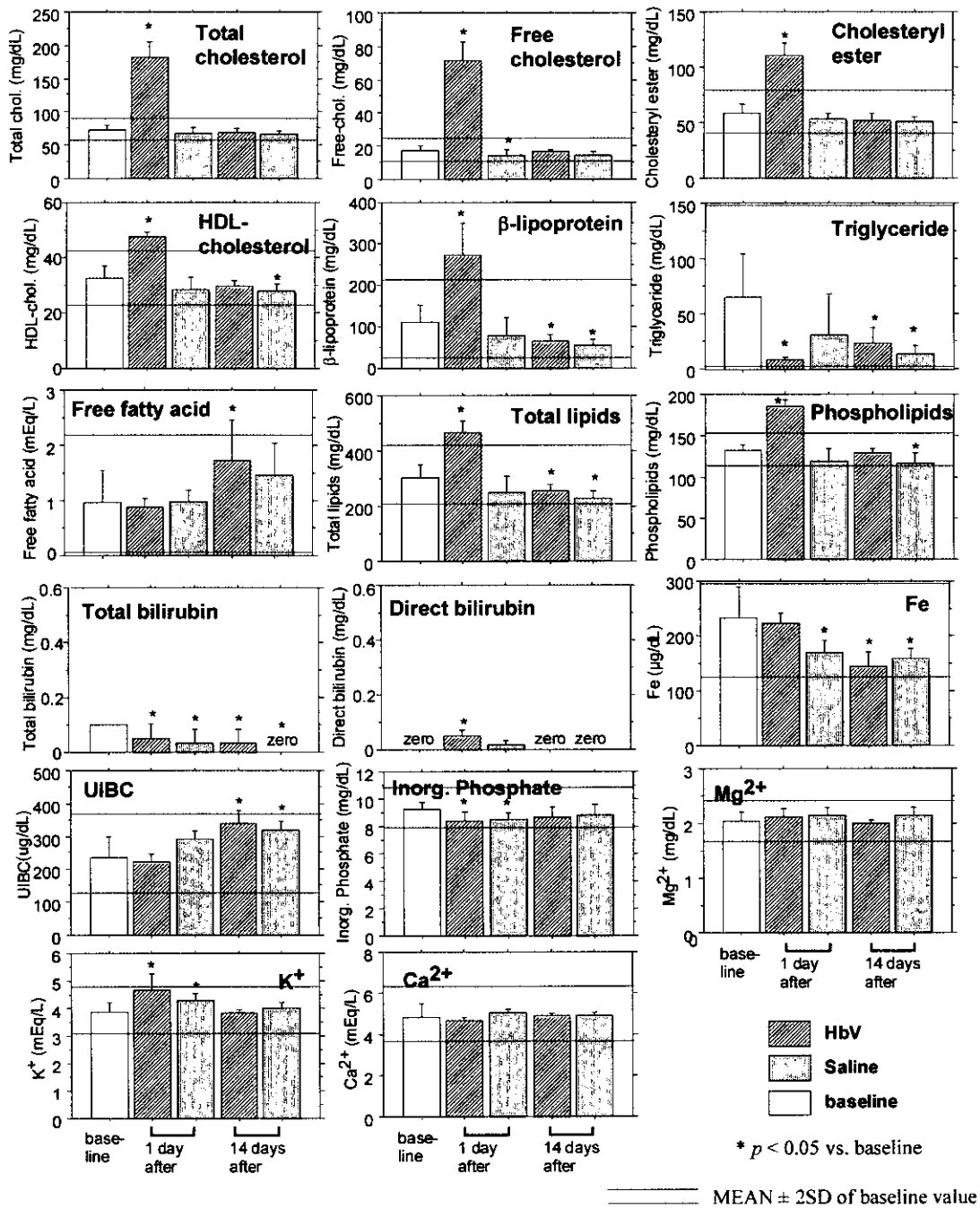


図 16 . Hb 小胞体反復投与翌日、および 1 4 日後の血液生化学的検査結果 (2)。

組織病理学的検討では、反復投与終了1日後に脾臓の赤脾随に多量のHb小胞体が認められた。肝臓Kupffer細胞内にも従来の投与実験と同様に認められた。また、今回新たに、腎臓の尿細管にあるmesangial細胞にも捕捉されていることが明らかになった。Berlin blue染色では捕捉部位にヘモジデリン染色部位が認められたことから、捕捉されたHb小胞体のヘム代謝が既に進行していることが明らかとなった。反復投与終了14日後には、Hb小胞体の像は認められなかったが、多量のヘモジデリンが脾臓、肝臓に(図17)、また骨髄に、また僅かに腎臓と副腎および心筋にも認められた。輸血に関する臨床知見として、輸血を瀕回受ける患者でもヘモジデリン沈着が多量に認められる。

沈着した鉄は溶解鉄イオンよりもフェントン様活性が低く、また極めて緩やかに消失することが知られているが、沈着鉄が臓器機能に及ぼす影響を今後十分に検討する必要がある。

D. 結論

Hb小胞体の安全性試験として、反復投与試験を実施した。循環血液量の実に2.5倍もの容量の投与を実施したが、ラットは全例生存し、体重も増加し続けた。脾臓と肝臓の重量が増大したが、2週間後にはほぼ正常値に戻った。血液生化学的検査で、脂質成分濃度の一過性増大とリパーゼ活性の亢進が認められたこと、また組織内にヘモジデリンが検出されたことについては、今後成分代謝過程や臓器機能への影響について詳細な検討が必要である。

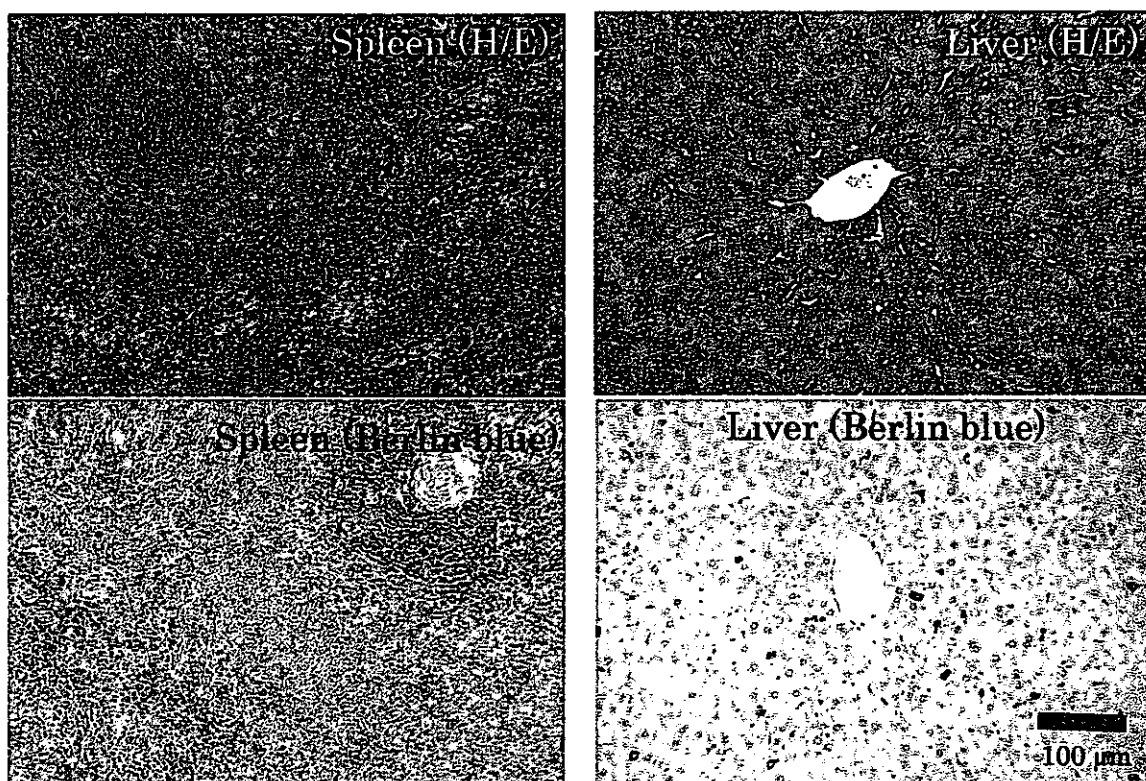


図17. Hb小胞体反復投与終了14日後の脾臓と肝臓の組織の顕微鏡写真。

5. Hb 小胞体投与が肺微小循環動態に及ぼす影響

A 研究目的

肺はガス交換を行う臓器として重要であり、全身の血流が還流するので、肺血管抵抗の変化はそのまま右心負荷の増減につながる。人工酸素運搬体の投与により、肺循環にどのような変化が起こるかを知ら、その原因を究明することは物質の改良につながる重要な知見である。

1990年代に開発が進んだ修飾 Hb のような分子状の人工酸素運搬体は、投与によって右室圧が持続的に上昇し、ガス交換の場である肺の微小循環への影響が考えられていた。本研究で対象としている Hb 小胞体は粒子径が 250 nm と大きく、血管内皮の Gap を通過せず、血管の収縮には変化がないことが予想された。しかし、平成 13 年度までのレーザー共焦点顕微鏡を用いた観察では、肺細小動脈で投与後 20 分間にわたって一時的な収縮が起こっており、右室圧も若干上昇する傾向にあることが明らかとなった。

肺血管のトーンは主として一酸化窒素の組織内産生量と濃度に依存することが種々の研究で明らかにされており、人工酸素運搬体投与時の一酸化窒素の動態の解明によって肺循環に対する人工酸素運搬体 (Hb 小胞体) の影響を明らかにできると考えられた。

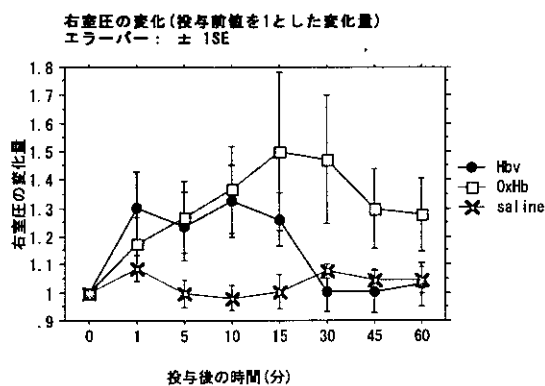


図 18. Hb 小胞体および oxyHb 投与後の右室圧の変化。

肺組織内の NO は外界である肺胞気と物理的な拡散によって平衡状態に達していると考えられるので、呼気中 NO の測定により、肺組織での NO 濃度を推定することとした。

平成 14 年度では、Hb 小胞体投与後に呼気中のガスに排出される内因性の一酸化窒素の濃度を測定し、右室圧および血管径の変化と内因性一酸化窒素の増減との関係を明かとする。

B 研究方法

(呼気中の一酸化窒素濃度の測定)

SD ラット(250~300g)を用い、全身麻酔、気管切開、気管内挿管下に人工換気を開始、 pCO_2 が 40-45 Torr となるように換気条件を設定し、PEEP は 5 cm とした。頸静脈にカニューレション後、頸静脈より 2 mL の Hb 小胞体(HbV)、酸素化した Hb 溶液(OxyHb)、または生理食塩水を投与した。投与前、投与直後、投与 15 分後、30 分後、60 分後にそれぞれ呼気を一分間アルミニウムバッグに捕集し(一回換気量は約 1.5 mL、換気回数は約 90 回/分)化学発光法を用いて呼気中の NO 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)手術は吸入麻酔による全身麻酔、気管内挿管後人工換気下に行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。

C. 結果

OxyHb 投与により右室圧は持続的に上昇している(図 18)が、呼気中に排泄される一酸化窒素濃度は投与後速やかに上昇し、投与 30 分後で $146 \pm 66\%$ 、投与後 60 分では投与前値の $161 \pm 79\%$ に増加していた。生食投与群、HbV 投与群では呼気中の一酸化窒素濃度に大きな変化はなく(生食群では投与 60 分後に投与前値の $106 \pm 12\%$ 、HbV 投与群では投与 60 分後に投与前値の $119 \pm 9\%$)、これらの群では内因性の一酸化窒素の産生に影響を与えていないと考えられた。(図 19)