

200401227A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

人工赤血球の安全性向上 に関する研究

(研究課題番号：H16-医薬-071)

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小林 絃一

(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 17 (2005) 年 4 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

人工赤血球の安全性向上 に関する研究

(研究課題番号：H16-医薬-071)

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小林 紘一
(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 17 (2005) 年 4 月

別添2

目次

I. 総括研究報告書	1~5
小林絃一（慶應義塾大学医学部 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 小林絃一（慶應義塾大学医学部 教授）	6~15
2. 池田久實（北海道赤十字 血液センター 所長）	16~23
3. 小田切優樹（熊本大学 医学薬学研究部 教授）	24~31
4. 村田 満（慶應義塾大学医学部 講師）	32~36
5. 合田亘人（慶應義塾大学医学部 講師）	37~39
6. 高折益彦（東宝さとう病院 名誉院長）	40~41
7. 土田英俊（早稲田大学 名誉教授／理総研 顧問研究員）	42~55
8. 甲斐俊哉（ニプロ(株)医薬品研究所 製剤研究室 室長）	56~59
9. 須賀裕子（(株)オキシジェニクス 京都研究所 主席研究員）	60~63
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	64~75
IV. 研究成果の刊行物・別冊	76~

人工赤血球の安全性向上に関する研究

主任研究者 小林 紘一 慶應義塾大学医学部 外科 教授

研究要旨

本研究では期限切れ赤血球より精製した高純度・高濃度ヒトヘモグロビン(Hb)を、リン脂質小胞体に内包した Hb 小胞体(平均粒径 250 nm)を生体に投与した際の安全性を確認し、臨床使用を行う際の注意点について総合的に検討することを目的としている。Hb 小胞体の製造、物性の改良、製造法の改良については 1997 年～2003 年までの間に厚生科学研究、および厚生労働科学研究として行われ、酸素運搬体としての機能解析と小動物での生体適合性を主体に検討が行われた。この研究で、基本物性の決定と製造法の基礎技術が確立し、室温で 2 年間保存可能な人工赤血球が完成した。

今年度は、Hb 小胞体の基本製造技術を元に中等量製造(3 L バッチ)を開始し、試料規格を設定するとともに規格に合致した試料を安定して製造できることが証明された。バッチにかかわらず均質な製品を供給できる体制が確立した。委託製造された Hb 小胞体の試料検定体制を整え、バッチごとに検定を行ったところ、脂質濃度に若干の変化を認めるものの、粒径、酸素親和性、Hb 濃度、LPS レベルは従来と同等であり、委託製造による中等量の製造が軌道に乗ったことを確認した。また、製造された Hb 小胞体分散液中の無菌試験を行い、いずれのロットでも無菌であることが確認された。Hb 小胞体の使用時に、Hb 小胞体の Hb 濃度の簡便な測定法を検討し、臨床用の測定機器で測定したところ、誤差が少ない機種があることが明らかとなり、正確な測定には Hb 小胞体を可溶化する前処理が必要であることが明らかとなった。試料製造体制の整備を受け、製造に関する指針を作成することを試み、Hb 小胞体が有すべき前臨床試験の内容について検討した。

動物を用いた安全性試験を以下の項目について行った。①Hb 小胞体が免疫系に及ぼす影響を補体活性、アナフィラキシー反応の面から検討した。Hb 小胞体の連続投与においても補体は一過性にわずかに低下するのみであった。また、アナフィラキシー反応あるいは類似の反応は認められなかった。リンパ球の芽球化の検討では低濃度の ConA 刺激で反応性の低下が認められたが、リンパ球が一過性にアナジーの状態に陥っている可能性が示唆された。②Hb 小胞体の体内動態解析では、マウスを用いて血中半減期、および臓器クリアランスを算出した。Hb 小胞体の濃度依存的な血中滞留時間の延長および臓器取り込み抑制が認められた。③血液凝固・線溶系に与える影響をラットの 15%交換輸血モデルを用いて検討し、凝固系では APTT が Hb 投与 24 時間後若干短縮する傾向が認められたが脱血による影響も加わっているものと考えられた。他の凝固因子の変化(フィブリノゲン、AT, PT) も脱血による影響であると考えられた。④Hb 小胞体を投与した際の微小循環局所での血管透過性の亢進についてはラットの脳虚血再灌流モデルで評価し、Hb を内包しない空の小胞体には脳浮腫を軽減する効果があることが明らかとなっ

た。⑤ビーグル犬を用い、50%出血性ショックモデルにおいて Hb 小胞体を蘇生液として使用し、ショックからの離脱・蘇生に有効であり、蘇生後の全身の酸素運搬および酸素消費においても輸血と変わらない有効性と安全性を示した。⑥Hb 小胞体投与後の長期的な生存、生体の変化に関する研究を行い、単回投与後 1 年間の観察では肥満と加齢による変化を認めるのみであった。また、Hb 小胞体で 40%の血液交換後 2 週間の観察では 7 日後に貧血の改善を認め、対象として行った赤血球輸血と同等の変化を認めた。次に、ラットを用いた 50%脱血ショック蘇生後の長期生存では蘇生後 14 日間の回復過程で自己血群と比べ大きな変化は無かった。更に、生体内での半減期をアイソトープラベルした Hb 小胞体を動物に投与して解析し、半減期はラットで 34.8 時間、ラビットで 62.2 時間であることが判明した。⑦霊長類を用いた安全性試験を実施し、単回投与では全身状態に大きな変化を与えないことが明らかとなった。

大量製造に向けて製造工程の検討を行い、Hb 小胞体製造における脱 CO 処理についてダイアライザーを用いる方法を開発し、良好な結果を得た。また、保存を行う際に必要な脱酸素処理工程を評価した。ついで粒子径の制御に関し検討を行い 260 nm 付近に中心粒径を持つことが明らかとなった。本年度の研究により格段の進歩が認められ、近い将来の臨床応用が期待される。

分担研究者

池田 久實	北海道赤十字血液センター	所長
小田切 優樹	熊本大学大学院薬学研究部	教授
村田 満	慶應義塾大学医学部	講師
合田 亘人	慶應義塾大学医学部	講師
高折 益彦	東宝塚さとう病院	名誉院長
土田 英俊	早稲田大学 理総研	顧問研究員
須加 裕子	(株)オキシジェニクス京都研究所	主任研究員
甲斐 俊哉	ニプロ(株)医薬品研究所製剤研究室	室長

A. 研究目的

いつでもどこでも血液型に関係なく、必要量を安全に供給できる人工赤血球の開発は、次世代医療に不可欠の課題である。昨年度の物性規格の決定と製造技術・工程の確立、小動物での投与安全性に関する研究の成果をふまえ、中等量の製造を開始し、安定した供給体制を確立する。また、対象とする動物種を増やして安全性を検討するとともに、臨床に即したモデルでの検討を行う。更に将来の臨床応用の際に必要な安全性評価指針を検討するとともに大量製造にむけた検討を開始することを目的とした。なお、Hb 小胞体は製造に特殊な

技術と広い知識を必要とするため委託製造に携わる研究者が分担研究者として研究に加わることとなった。

平成 16 年度の研究項目は、①委託製造による中等量(3 L バッチ)の Hb 小胞体製造における規格設定と安定的な製造、および検定、②安全性評価指針、臨床試験プロトコル作成の検討、③動物を用いた安全性の検討(a. 免疫系に及ぼす影響、b. 体内動態の特性、c. 血液凝固・線溶系に与える影響、d. 血管透過性に与える影響、e. ラットにおける 40%血液交換モデル長期生存における検討、f. ラット 50%脱血ショックモデルにおける Hb 小胞体によ

る蘇生後長期生存の検討、g. ラット単回投与後の1年間生存試験、h. ビーグル犬出血性ショックモデルに対する蘇生効果の検討、i. 霊長類への投与による安全性の検討)、④Hb小胞体の血中濃度を検定するための検査法を検討する、⑤大量製造技術の検討である。

B. 研究方法

Hb小胞体の安定供給のためラボスケール(3Lバッチ)での製造技術の確立を行い、製造したHb小胞体の物性を検定することにより製造技術の安定性を評価した。

研究班の班員の各施設および人工赤血球に関心のある施設においてHb小胞体が必要とする機能について討論し、前臨床試験として必要な条件をまとめた。また、有識者より人工赤血球製造に関して望まれる事項を聴取し、Hb小胞体製造に関する指針の作成を試みた。

動物での安全性を検討するために以下の方法を用いた。

a. 免疫系に及ぼす影響をラットを用い連続投与中の補体活性値の変動を測定することにより評価し、アナフィラキシー反応の評価を一定間隔で3回投与するモデルで検討した。更に低濃度コンカナバリンA刺激による脾臓リンパ球の反応性の変化を指標に検討した。

b. 体内動態の特性についてはマウスを用い、アイソトープ標識をしたHb小胞体を投与することによって血中半減期および臓器クリアランスを算出、評価した。また、原子吸光分析法による鉄濃度の推移を検討し、アイソトープを用いた評価が妥当であることを明らかとした。

c. 血液凝固・線溶系に与える影響に関してはラットを用い、経時的に凝固系の指標を測定し、凝固・線溶系に与える影響を評価した。

d. 血管透過性に与える影響に関してはマウスを用いて脳虚血再灌流モデルを作成し、血管透過性

の指標としてエバンスブルーの蓄積を評価した。

e. ラットにおける40%血液交換モデル長期生存における検討では対照群としてラット保存血を投与するモデルを作成し、比較した。

f. ラット50%脱血ショックモデルにおけるHb小胞体による蘇生後長期生存の検討では、ショック状態をHb小胞体により治療し、14日間の回復過程を観察、血液生化学検査を実施した。

g. ラット単回投与後の1年間生存試験では20ml/kgのHb小胞体を投与した後1年間生存させ、血液生化学検査と病理学的検索を行った。

h. 中動物出血性ショックモデルに対する蘇生効果の検討ではビーグル犬を用いて50%脱血ショックモデルを作成、右心系の評価も含めた循環動態の変動と酸素運搬能について検討した。

i. 霊長類への投与による安全性の検討では、カニクイサルを用いてHb小胞体を単回投与し、2週間の観察と血液生化学的検査を行った。

大量製造技術の開発は、工程ごとに大量調製を可能とするため、効率化の検討を行った。

C. 研究結果および考察

ラボスケール(3Lバッチ)でのHb小胞体の製造技術は、早稲田大学理工学総合研究センターより技術移転を受け製造の確立を行った。製造したHb小胞体の物性はオキシジェニクス、および早稲田大学でバッチごとに検定を行い、基準範囲内にあることが確認され、製造技術の安定性が評価された。また、バッチごとに無菌化試験を行い、製造工程での細菌の混入がないことが確認された。

研究班の班員の各施設および人工赤血球に関心のある施設においてHb小胞体が必要とする機能について討論し、前臨床試験として必要な条件をまとめ、班会議の場で班研究にフィードバックし、安全性の研究に欠損部分が無いよう研究の方向を修正した。また、有識者より人工赤血球製造に関して望まれる事項を聴取し、Hb小胞体製造に関する

人工赤血球の安全性向上に関する研究

分担課題： Hb 小胞体が免疫系に及ぼす影響

分担研究者	池田久實	北海道赤十字血液センター	所長
	東 寛	北海道赤十字血液センター	研究部長
	藤原満博	北海道赤十字血液センター	研究部
	阿部英樹	北海道赤十字血液センター	研究部
	山口美樹	北海道赤十字血液センター	研究部

研究要旨

ポリエチレングリコール修飾 Hb 小胞体投与が免疫系に及ぼす影響について、ラットを用いて検討した。Hb 小胞体の連続投与においても一過性に補体はわずかに低下するものの生理食塩水投与群と同じレベルまで回復した。また、Hb 小胞体を一定間隔で 3 回投与したがアナフィラキシー反応もしくは類似の反応は全く認めなかった。Hb 小胞体投与 6 時間後に採取した脾リンパ球は、一過性であるが低濃度のコンカナバリン A (Con A) に対して反応性の低下を示した。リンパ球は一過性にアナジーの状態に陥っていること、その原因として NO の産生が高まっていることが考えられた。補体の低下、リンパ球の反応性の低下はいずれも一過性であることから、重篤な有害事象に結びつく可能性は少ないと考えられるが、今後は、これらの機序を解明する必要がある。

A. 研究目的

これまで、Hb 小胞体の安全性についてヒト及びラット血液を用いた *in vitro* の検討、ラットを用いた *in vivo* の検討を行ってきた。その結果、血漿凝固系、カリクレイン-キニン系、補体系および血小板機能にほとんど影響を与えないこと、僅かに影響があったとしても臨床的意義を持つかどうか疑問であることを示してきた。またラットへの投与では、血球細胞の割合や補体価に変化がみられたものの、いずれも小さく一過性の変化であった。免疫系への影響について検討を行ったところ、コンカナバリン A (Con A) 刺激による脾臓 T 細胞増殖反応は、Hb 小胞体投与 6 時間後の細胞では高濃

度 Con A に対する応答性は維持していたが、低濃度 Con A に対する応答性が低下した。応答性の低下は経時的に回復し、投与 3 日後の脾細胞では生食投与群と同等の反応性を示した。

今回は Hb 小胞体連続投与が補体価に及ぼす影響、Hb 小胞体投与によるアナフィラキシー反応の有無、低濃度 Con A 刺激による脾細胞増殖反応低下の詳細について検討した。

B. 研究方法

Hb 小胞体連続投与による補体価への影響

WKAH ラット、♂、8 週齢、体重約 220-250 g

を用い、循環血液量の 20% (v/v)に相当する Hb 小胞体 (約 2.8 mL) をエーテル麻酔下、尾静脈よりプレーン採血の後、輸注した。コントロール群には同量の生理食塩水を輸注した。3 日後にプレーン採血後、再度 Hb 小胞体あるいは生食を輸注した。初回輸注 3 日後と同様、6、9、12 日目にも採血および輸注を行った。12 日目以降は経時的に採血をした。

採血液は、室温で 1 時間、引き続き 4°C で 1 時間静置の後、3,000 rpm×20 min、4°C で遠心し、その上清をさらに 15,000 rpm×45 min、4°C で遠心して Hb 小胞体を沈殿させ、その上清を血清として -80°C 保管した。全検体を採取した後、血清中の補体価 CH50 をキット (NEW ワンポイント CH50KW, 日本ビーシージーサプライ) を用いて測定した。

アナフィラキシー反応の検討

アレルギー反応に敏感な Brown Norway (BN) ラット、♂、8 週齢、体重約 180-200 g を用い、エーテル麻酔下にて Hb 小胞体と同じ脂質組成でヒト Hb を含まない空小胞体 (2.5 mL) を尾静脈より輸注した。それから 2、4 週間後に 1 mL、8 週間後に 2 mL の Hb 小胞体を尾静脈より輸注した。コントロールとして同量の生理食塩水を輸注した。投与後の異常の有無を観察した。

またアナフィラキシーショックモデルとして、1 mg 卵白アルブミン (OVA) を完全フロイトアジュバントと共に、エーテル麻酔下 BN ラットの後肢前部に皮下投与した。2 週間後、尾静脈より 0.1 mg OVA を投与した。投与後、異常の有無を観察した。

低濃度 Con A 刺激による脾細胞機能の検討

WKAH ラット、♂、10-18 週齢、体重約 300-410 g を用い、循環血液量の 20% (v/v)に相当する Hb 小

胞体 (約 3.3-4.6 mL) をエーテル麻酔下、尾静脈より輸注した。コントロール群には同量の生理食塩水を輸注した。投与 6 時間にエーテル麻酔で犠牲死し、無菌的に脾臓を摘出した。培地 (RPMI/FCS/2-ME: RPMI 1640/10% FCS/50 μ M 2-mercaptethanol) 5 mL に浸した脾臓をディッシュ中ですりつぶし、その懸濁液を遠心チューブに移して静置することにより、大きな組織塊を沈降させた。上清を 2,000 rpm×5 min 遠心し、沈殿した細胞を RPMI1640 で洗浄した後、塩化アンモニウム-トリス緩衝液 (IBL 免疫生物研究所) 5 mL にて 3-5 分間溶血処理をした。溶血処理細胞液に 5 ml の RPMI/FCS/2-ME を加えた後、遠心、洗浄を行い、最後に RPMI/FCS/2-ME に懸濁して脾細胞とした。

脾細胞中に含まれる単核球の割合を、APC 標識抗 CD3 抗体 (BD)、FITC 標識抗 CD45R 抗体 (BD)、PE 標識抗 MHC class II 抗体 (Immunotech)、FITC 標識抗 CD25 抗体 (BD)、FITC 標識抗 CD11b 抗体 (BD) を用い、フローサイトメーター (LSR, 日本ベクトンディッキンソン) にて測定した。脾細胞 1×10^5 個を含む懸濁液に各種抗体を加え、4°C、暗所で 10 分間インキュベーションした。陰性コントロール抗体を加えた細胞も同様に処理した。インキュベーション後 PBS で洗浄、遠心し、propidium iodide (PI) 染色で死細胞をゲートアウトした 4 カラーフローサイトメトリー解析を行った。

Con A 刺激による脾細胞の反応を検討した。T リンパ球増殖反応は丸底 96 穴プレートに RPMI/FCS/2-ME に懸濁した脾細胞を 2×10^5 個/200 μ L/ウェル、Con A を終濃度 0, 0.3, 3 μ g/ml になるように triplicate で分注し、37°C、5% CO₂ にて培養した。培養 72 時間後に各ウェルに 18.5 kBq の ³H-デオキシチミジン (アマシャム) 10 μ L を添加し、

その24時間後にセルハーベスタにて細胞を回収した。細胞DNAに取り込まれた³H-デオキシチミジン量を液体シンチレーションカウンタにて測定した。また、脾細胞を24穴プレートに1×10⁶個/mL/ウェルで播種し、Con Aを終濃度0, 0.3, 3 μg/mlになるように添加し、37°C、5% CO₂にて48時間培養した。培養後、細胞の活性化T細胞の割合、アポトーシスT細胞の割合、培養上清中のサイトカイン濃度、一酸化窒素(NO)濃度を測定した。細胞の活性化T細胞の割合、アポトーシスT細胞の割合は、APC標識抗CD3抗体、FITC標識Annexin V、PE標識抗CD25抗体(BD)、PIを用い、フローサイトメーターで解析した。サイトカインは、IL-2はELISA(R&D)にて、その他のものはBio-Plex Cytokine Assay(BioRad)にて測定した。NO濃度はGriess反応によりNO₂⁻として測定した(R&D)。上記の測定は、培養時に終濃度250 μMのNO合成酵素(NOS)阻害剤L-NMMAや各種濃度のIL-2(R&D)を添加した系においても検討した。

C. 結果

Hb小胞体連続投与による血中補体価の変動

Hb小胞体の初回投与後3日目に血中補体価が低下することが再現された(Fig. 1)。しかし、その後3日目、6日目、9日目、12日目と投与を重ねたが、血中補体価の低下傾向は認められず、その値はむしろ投与前(あるいは生理食塩水投与群)と同じレベルまで回復していった。

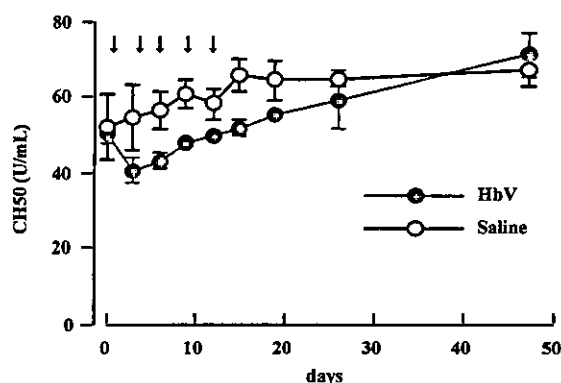


Fig.1 Changes of complement in rat peripheral blood after repeated HbV injection.

アナフィラキシー反応の検討

陽性コントロールとして、OVAを用いた。OVAを皮下に投与した群では、初回投与では、いずれも何ら症状は無かったが、2ndチャレンジ後は、全例(3匹)とも3分以内にアナフィラキシー様症状を示し死亡した(Table 1)。しかしながら、Hb小胞体、あるいは生理食塩水を投与したラットは、初回投与、2nd、3rd、4th投与いずれにおいても何ら副作用(アナフィラキシー様症状)が認められず、全例生存した。

Table 1

Lack of anaphylactic shock on rat injected with Waseda/Keiou liposome

Injection	1st	2nd	3rd	4th
Liposome (n=3)	Alive symptomless	Alive symptomless	Alive symptomless	Alive symptomless
Saline (n=3)	Alive symptomless	Alive symptomless	Alive symptomless	Alive symptomless
OVA (n=3)	Alive symptomless	Dead within 3 min with respiratory distress and hypotension		

低濃度 Con A 刺激による脾細胞機能の検討

平成15年度までの結果では、Hb小胞体投与後にCon A刺激による脾細胞のT細胞増殖反応をみたところ、Hb小胞体投与6時間後の細胞では高濃

度 Con A に対する応答性は維持していたが、低濃度 Con A に対する応答性が低下していること、応答性の低下は経時的に回復し、投与 3 日後の脾細胞では生食投与群と同等の反応性を示したことを報告した (Fig. 2)。

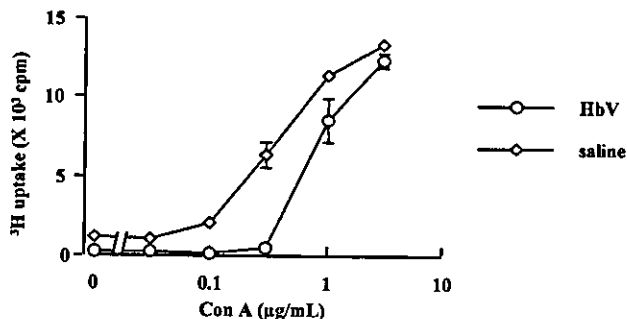


Fig. 2 Con A-stimulated T cell proliferation of rat splenocytes at 6 hrs after HbV injection. N=3, Mean ± SEM.

今年度はまず、脾細胞中のリンパ球およびマクロファージ分画の変動をフローサイトメトリーにて検討したが、Hb 小胞体負荷前後で明かな変化は認められなかった (データは示さず)。また、投与 6 時間後においても生理食塩水投与群との間にも明かな差を認めなかった (Fig.3)。

これらの結果から、ConA に対する反応性の低下は反応に関与する細胞の量的な変動によるものではないと推定された。

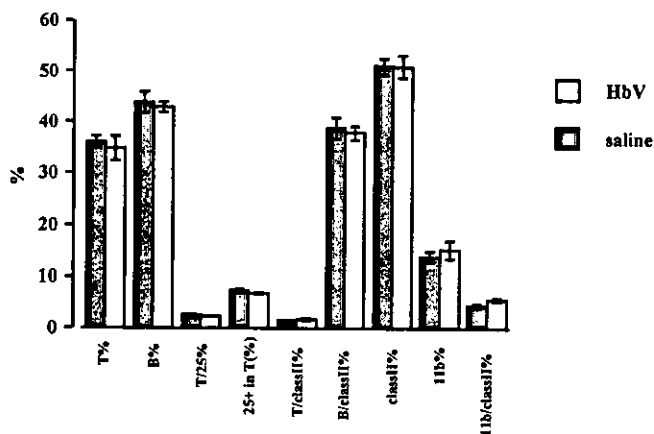


Fig. 3 Flow cytometric analysis of rat splenocytes at 6 hrs after HbV injection.

今年度は、このことを踏まえて、Con A 刺激により誘導されると考えられる、T 細胞上の IL-2 レセプターの発現、T 細胞の増殖因子である IL-2、その他の各種のサイトカインおよび NO の産生量、アポトーシスに陥る細胞の割合について Hb 小胞体投与群と生理食塩水投与群について比較検討した。同時に NO の産生を抑制する L-NMMA を反応系に投与した系も検討した。

Hb 小胞体投与 6 時間後に採取した脾細胞の Con A (0.3µg/ml) 刺激による増殖反応の抑制は、L-NMMA の存在下では生理食塩水投与群に近いレベルまで回復することが確認された (Fig. 4)。この時 Con A 刺激下での NO の産生量は、Hb 小胞体投与群が生理食塩水投与群より高く、L-NMMA 存在下では生理食塩水投与群と同じレベルであった (Fig. 5)。

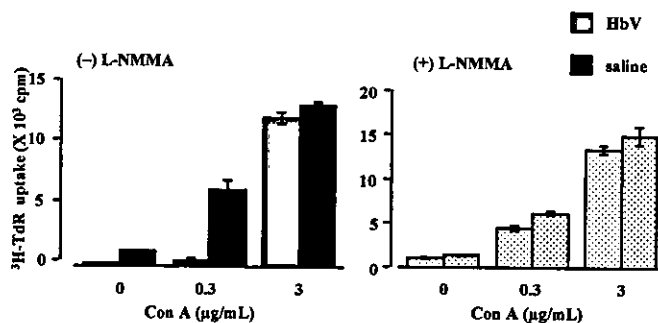


Fig. 4 Effects of NOS inhibitor, L-NMMA, on rat splenocyte proliferation stimulated by Con A. N=3, Mean ± SEM.

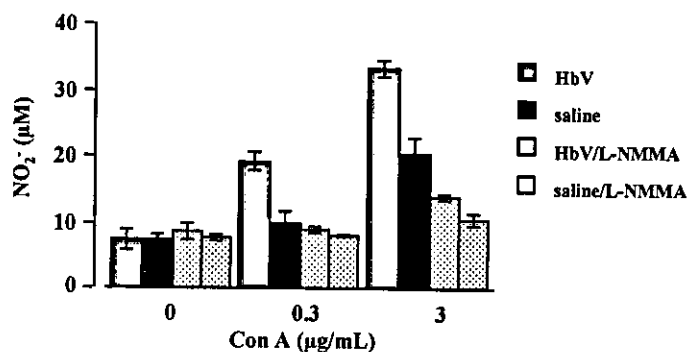


Fig. 5 NO production from rat splenocytes stimulated by Con A. N=3, Mean ± SEM.

Con A 刺激後 48 間後の IL-2 レセプター α 鎖の発現は、生理食塩水投与群との間に差は無かった。また培養上清中に分泌された IL-2 の量も生理食塩水投与群との間には差を認めなかった。(Fig.6,7)。

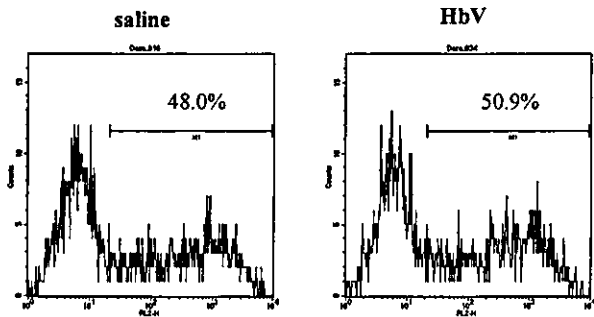


Fig. 6 Intensity of CD25 expression on T cells in rat splenocytes at 48 hrs after Con A (0.3 µg/ml) stimulation.

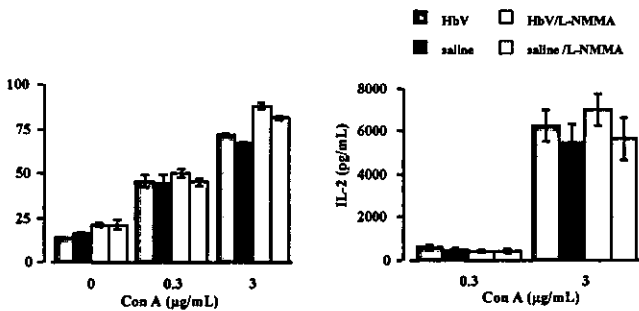


Fig. 7 Effects of NOS inhibitor, L-NMMA, on rat splenocyte activation by Con A. N=3, Mean \pm SEM.

IL-2 以外のサイトカインの産生は、調べた限りでは程度の差はあるが TGF- β を除きいずれも Con A(0.3 µg/ml)刺激で生理食塩水投与群より Hb 小胞体群が高い傾向が認められた。しかし L-NMMA 存在下でもそれらの産生は変化が無かった。TGF- β は刺激の有無に関わらず産生が認められた (Fig.8,9,10)。

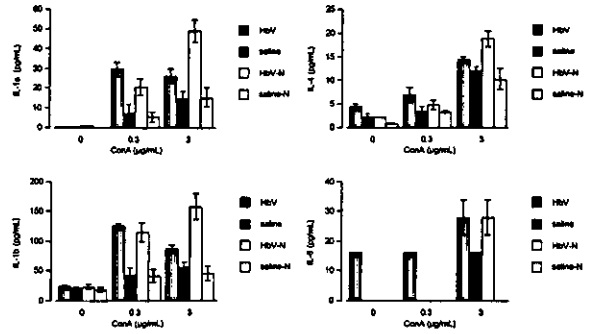


Fig. 8 Effects of NOS inhibitor, L-NMMA, on rat splenocyte cytokine production by Con A.

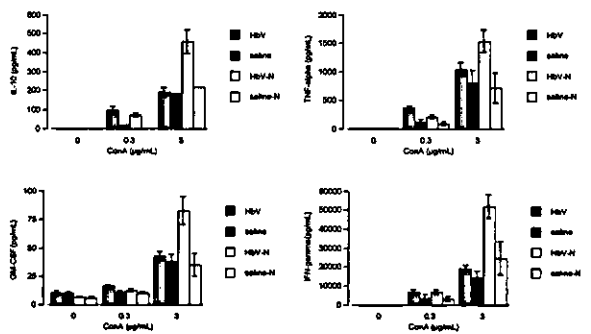


Fig. 9 Effects of NOS inhibitor, L-NMMA, on rat splenocyte cytokine production by Con A.

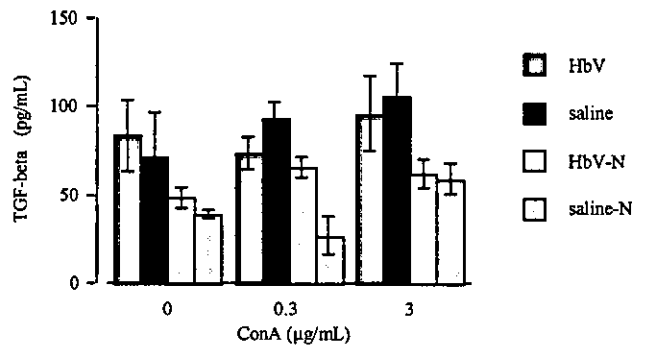


Fig. 10 Effects of NOS inhibitor, L-NMMA, on rat splenocyte cytokine production by Con A.

反応系に IL-2 を添加することにより T 細胞の増殖の抑制が解除されるか否かを検討した (Fig.11)。生理食塩水投与群では IL-2 の添加により Con A(3 µg/ml)と同じレベルまで増殖が増強したが、Hb 小

胞体投与群は、IL-2 添加による明かな増強効果は認められなかった。同様のことが、Con A 未刺激で高濃度の IL-2 のみを加えた場合も認められた (Fig.12)。

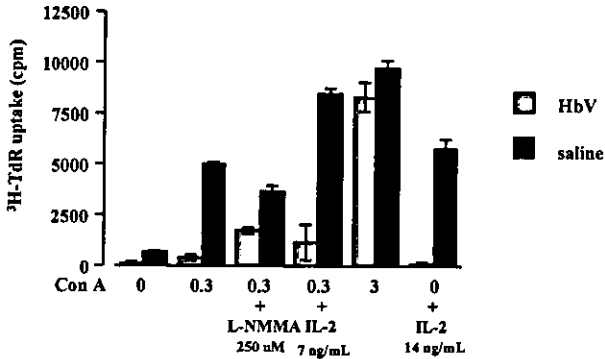


Fig. 11 Effects of NOS inhibitor, L-NMMA, or IL-2 on rat splenocyte activation by Con A. N=3, Mean \pm SEM.

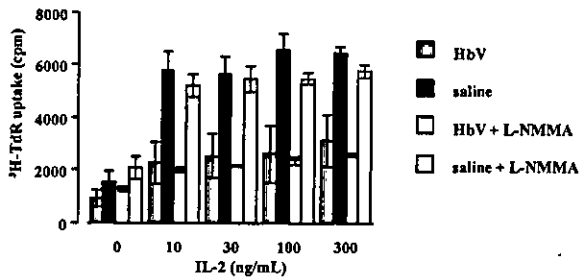


Fig. 12 Proliferative response of rat splenocyte by IL-2 with or without NOS inhibitor, L-NMMA. N=3, Mean \pm SEM.

D. 考察

異物としてのリン脂質小胞体を生体内に投与するにあたり、懸念されてきた有害事象の一つに血中の補体との相互作用がある。いままでに、in vitro では Hb 小胞体と補体との相互作用は認められなかったが、ラットへの 1 回投与により一過性の補体価の低下を認めていた。今回は Hb 小胞体を連続投与したが、初期に一過性に補体価が低下したが、投与を重ねるたびに低下してゆくことはなく、む

しろ投与期間中から 生理食塩水投与群と同じレベルまで回復していった。一過性の補体低下の理由はいまだ不明であるが、Hb 小胞体を細網内皮系細胞が大量に貪食することが引き金となっていると推定される。この後、細網内皮系細胞内にある Hb 小胞体を代謝するための酵素の誘導などを経て、Hb 小胞体の負荷に対応できる状態となった。あるいは、Hb 小胞体の貪食に抑制がかかり、補体系への影響がストップしたなどが考えられる。Hb 小胞体の 1 回投与後 3 日目に補体の低下を認めたことから、投与間隔を 3 日とした。しかし連続投与でも、補体の低下は一過性であったという結果から、補体低下は一過性で生体防御能を損なう心配はなく、連続投与でさえも問題ないと推定できよう。

Hb 小胞体の生体内への投与で懸念される有害事象の一つとしてアナフィラキシー反応（あるいはショック）がある。Hb 小胞体を一定の間隔をあけて 3 回投与したが、観察した限り、ラットへの影響は認められなかった。比較として OVA を投与したラットは全例 2 回目の投与終了後に死亡した。このことから、Hb 小胞体の抗原性は低く、連続投与によってもアナフィラキシー反応は発生しないと考えられる。

Hb 小胞体は投与後、細網内皮系（主として肝臓および脾臓）に集積することがわかっており、Hb 小胞体を大量に貪食したマクロファージを介して何らかの免疫学的な変容が起こっている可能性がある。そこで Hb 小胞体投与後に脾臓から単核球を取り出しその免疫学的な機能解析を行った。

Hb 小胞体投与後に取り出した脾細胞を非特異的マイトージェンである Con A (濃度 0.3 μ g/ml) で刺激すると、投与 6 時間後に採取したものでは、増殖反応の低下が認められ、この低下は時間とともに

に回復し、投与後 3 日目では認められなくなったことから一過性であることは既に報告した。

今回の検討から、T 細胞の反応性の抑制は、一過性のアナジー（種々の免疫抑制機構による不応性の状態）によるものと考えるのが妥当である。言い換えると Con A 刺激により活性化した T 細胞が高親和性の IL-2 レセプターを発現し、そこに IL-2 が作用した後の細胞内増殖シグナルの伝達系に増殖抑制を惹起する一過性の原因があると考えのが自然である。その理由として脾細胞のサブセット、刺激後 48 時間後のアポトーシス細胞の割合、T 細胞表面の IL-2 レセプター α 鎖の発現、培養上清中の IL-2 濃度は生理食塩水投与群との間に差がなかったこと、および増殖反応が抑制された T 細胞に IL-2 を添加しても増幅反応の明かな回復が無かったことが上げられる。高濃度の IL-2 添加にも関わらず、Hb 小胞体投与群の脾細胞は殆ど増殖反応を示さなかったこともこのことを支持している。今後、IL-2 レセプターから下流の細胞内シグナル伝達系の検討が必要と思われる。また、抑制性の T 細胞集団などの誘導が起こっている可能性も念頭におく必要がある。

低濃度(0.3 $\mu\text{g/ml}$)の Con A 刺激に対する反応性の低下は、反応系に産生される NO に依存している可能性がある。このことは iNOS の阻害剤である L-NMMA により反応性が回復することから類推できる。また、実際に反応系の NO 量が Hb 小胞体投与群で高く、L-NMMA 投与でその産生が完璧に抑制されている一方でサイトカインなど他のパラメーターは L-NMMA で殆ど変化していない結果もこのことと矛盾しない。

培養上清中のサイトカインの中で、増殖抑制に直接関与していると思われるものは、調べた限り

では認められなかった。特に免疫反応の抑制に関与するとされる IL10、TGF- β の動態は、この反応系では抑制に関与していると推定できるものでは無かった。ただし、NO の誘導作用があるとされる IL-1 は、Con A (0.3 $\mu\text{g/ml}$)刺激では生理食塩水投与群より高く、従って NO の誘導に関与している可能性はある。

E. 結論

Hb 小胞体の投与後、Con A 刺激に対する免疫応答の一過性の低下が認められる。その際、T 細胞は一過性のアナジー状態になっているものと推定される。アナジー状態を引き起こす原因としては、Con A 刺激に伴って産生される NO の影響が考えられる。今後は、NO 産生の機序、T 細胞のアナジー状態の分子レベルでの解析を行うことが必要である。高濃度(3 $\mu\text{g/ml}$)の Con A 刺激では全く抑制がかからず低濃度(0.3 $\mu\text{g/ml}$)の Con A 刺激においてのみ抑制がかかった理由は不明である。低濃度の Con A に対する T 細胞の応答にはマクロファージ依存性が強いということと関連している可能性があるが、今後の検討課題である。

今回 T 細胞の増殖反応に用いた Con A は非特異的なマイトージェンであることから、Hb 小胞体投与の抗原特異的な免疫応答に与える影響を検討する必要がある。その際、抗原刺激に対する細胞性免疫応答だけではなく液性免疫応答に対する影響も検討しなければならないと考える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. Y. Yamada-Ohnishi, H. Azuma, N. Urushibara, M. Yamaguchi, M. Fujihara, T. Kobata, H. Ikeda. Cytotoxic difference of T cells expanded with anti-CD3 monoclonal antibody in the presence and absence of anti-CD28 monoclonal antibody. *Stem Cells Development*. **13**, 315-322 (2004)
 2. 漆原範子、山田淑子、宮崎孔、山口美樹、村橋秀明、関本達也、佐藤進一郎、加藤俊明、藤原満博、東寛、池田久實. Edstein-Barr virus 特異的 CD4 陽性 bulk cytotoxic T lymphocytes の ex vivo 増幅と解析. *Jpn.. J. Transfusion Medicine*. **50**, 588-595 (2004)
 3. 伊藤のぞみ、佐藤典宏、茂木祐子、荒関みき、山本定光、東寛、池田久實、宮崎保. 臍帯血凍結保存状態に関する保管検体による評価の有用性の検討. *Jpn.. J. Transfusion Medicine*. **50**, 620-625 (2004)
 4. S. Wakamoto, M. Fujihara, N. Urushibara, K. Morishita, S. Kaneko, H. Yasuda, H. Takayama, S. Yamamoto, H. Azuma, H. Ikeda. Heterogeneity of platelet responsiveness to anti-CD36 in plasma associated with adverse transfusion reactions. *Vox Sang*. **88**, 41-51 (2005)
 5. S. Wakamoto, M. Fujihara, H. Abe, M. Yamaguchi, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Azuma and H. Ikeda. Effects of hemoglobin vesicles on resting and agonist-stimulated human platelet in vitro. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* (2005) (in press)
- (総説)
6. 阿部英樹、東寛、平山順一、池田久實 / ウィルス不活化の現状と課題. *人工血液*. **12** , 104-113 (2004)
 7. 東寛、池田久實. 血液事業の新しい動き－8項目の安全強化対策について－. *人工血液*. (2005) (in press)
- 2. 学会発表**
1. 阿部英樹, 他 / ヘモグロビン小胞体 (HbV) 投与がラット免疫系に及ぼす影響 / 第 11 回日本血液代替物学会総会 / 2004.7.13-14 / 札幌市
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
- 該当なし

人工赤血球の安全性向上に関する研究

分担課題： Hb 小胞体が血球や血液凝固線溶系に与える影響

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部 内科 講師

研究要旨

Hb小胞体投与が血球や血液凝固線溶系に与える影響を、ラット脱血モデルを用いin vivoで検討した。Wistar系雄性ラット9週齢（体重290～310g）の頸静脈から全血液の15%相当量を脱血後、同量のHb小胞体、また比較としてHbを内包しない空球小胞体、または生理食塩水を静注した。静注1時間後、24時間後に採血し、血液学的検査値および凝固学的検査値を測定した。(1) 予備検討の結果、APTT、PT、フィブリノゲン、アンチトロンビン(AT)等に関してはヒトの測定試薬で測定可能であった。一方、血管内皮障害の指標の一つであるvon Willebrand因子(vWF)は小胞体の存在によりその測定が困難となることが判明した。(2) Hb小胞体投与は血液学的検査値（白血球数、赤血球数、血小板数など）に殆ど影響を与えなかった。凝固系では、PTに影響を与えなかったが、APTTは24時間後に若干短縮する傾向がみられた。フィブリノゲン、ATは24時間後に若干上昇する傾向が見られたが、この傾向は比較対照群でも見られるため脱血による影響が強いと思われた。以上より、Hb小胞体はin vivoの実験において血球数や血液凝固系に殆ど影響を与えないことが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究は、人工赤血球の安全性評価を目的とし、(1) in vitro 研究としてヒト血液にHb小胞体を添加し、凝固線溶系検査値への影響や血小板機能への影響、(2) in vivo 研究としてラットにHb小胞体を投与した際の血時間、血栓形成能への影響、を検討している。

一般に通常生体内で血液は凝固することなく流動性を保っているが、これは幾つかの生体機能が絶妙に働いて血液凝固/抗凝固のバランスが保たれている結果である。一般に血球や血管内皮細胞には、互いに結合しあう為の幾つかの接着分子や受容体があり、これらを介して細胞同士の接着がおこる。血液凝固因子は通常これらの細胞によって活性化されることはないが、一方では病的状態の細胞や異物表面は血液凝固因子の活性化を引

き起こすことが知られている。人工赤血球を生体に投与する上で血液凝固因子や血球の活性化による血栓形成の可能性は重大な問題である。15年度までの研究では、Hb小胞体が血球や血液凝固線溶系に与える影響を、ヒト全血を用い in vitro で検討した。検討の結果、Hb小胞体の通常の凝固検査への影響は概して少ないが、一部の発色基質を用いた検査（プラスミノゲン、 $\alpha 2$ プラスミンインヒビター、一部の凝固因子の定量など）に影響することが判明した。また、止血能/線溶能を総括的に評価するGoerog's Thrombosis Test (GTT)を用いた実験、および全血血小板機能測定装置PFA-100を用いたin vitro 血小板機能の検討でも、Hb小胞体は一部の条件を除き止血能や血栓溶解能に大きな影響を与えないと考えられた。そこで今年度は、ラットにHb小胞体を投与し、この際に体内で起こる血

学的変化、血液凝固学的変化を、ラットの血液試料を用いることで検討した。

B. 研究方法

ラットにHb小胞体を投与し、一定時間後に採血、血液学的、凝固学的検査値を測定した。すなわち、Wistar系雄性ラット9週齢（体重290～310g）の頸静脈から全血液の15%相当量を脱血後、同量のHb小胞体、比較として、Hbを内包しない空球小胞体、または生理食塩水を静注した。投与1時間後、24時間後頸静脈より3mlを3.8%クエン酸Na入り真空採血管に採血、血液を遠心分離し、得られた血漿や血清を用いて血液学的検査値および凝固学的検査値を測定した。

C. 研究結果

(1) ラットでの凝固学的検査の可否の検討

ラット血漿において、ヒトと同じ試薬で測定可能な凝固系マーカーは活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT), プロトロンビン時間 (PT), アンチトロンビンIII (ATIII), トロンビン・アンチトロンビンIII複合体 (TAT), フィブリノゲン、線維素分解産物 (FDP) であった (Table 1)。von-Willebrand 因子 (vWF) も測定値は示したが、少なくともヒトの検査試薬では低値を示すことが判明した。

(2) ラットへのHb小胞体投与が血液学的、凝固学的検査に与える影響

血球系ではHb濃度を除きHb小胞体による影響は見られなかった (Fig. 1-4)。

Table 1 正常ラットにおける凝固系マーカーの測定結果 (1)

<検査済み>

施設	項目	検査方法	単位	ヒトでの基準値	測定結果	n
SRL	APTT	Langdell法 (散乱光度法)	秒	25～40	32.9±6.8	12
	PT	Quick一段法 (散乱光度法)	秒	10～13	13.0±0.9	12
	ATIII	発色合成基質法	%	79～121	101.7±11.6	15
	TAT	ELISA	ng/ml	3.0以下	別表参照	15
	第Ⅷ因子様抗原定量 (vWFAg)	ラテックス凝集反応	%	50～155	63.0±3.9	15
	vWF活性	固定血小板凝集法	%	60～170	15.0±5.6	15
	フィブリノゲン	トロンビン凝固時間法	mg/ml	150～400	246.9±13.6	13
研究室	FDP	FDPLテスト	μg/mL	5以下	すべて2.5以下	14

*検査試薬はすべて人用

以上の結果より上記の項目はラット血液にて検査可能と考えた。

<未検討>

施設	項目	検査方法	ヒトでの基準値	種類
研究室	CRP	ELISA	94～494 μg/ml	ラット用
	P-セレクチン			ヒト用
				マウス用

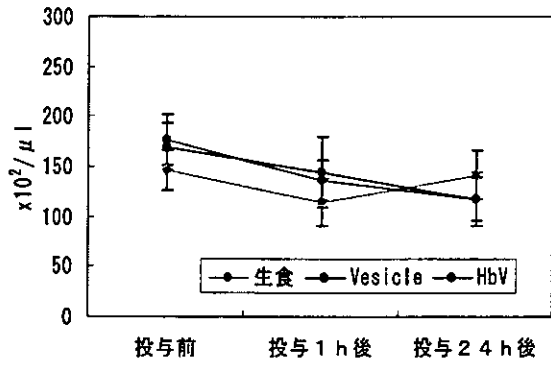


Fig. 1 WBC

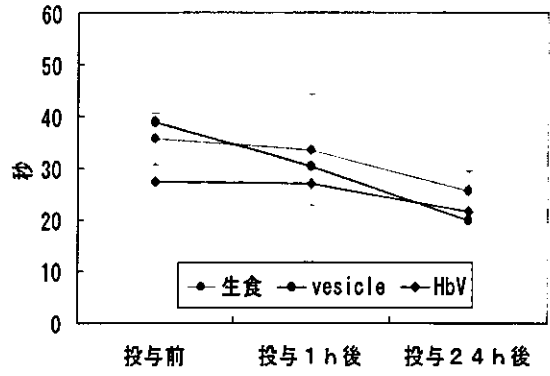


Fig.5 APTT

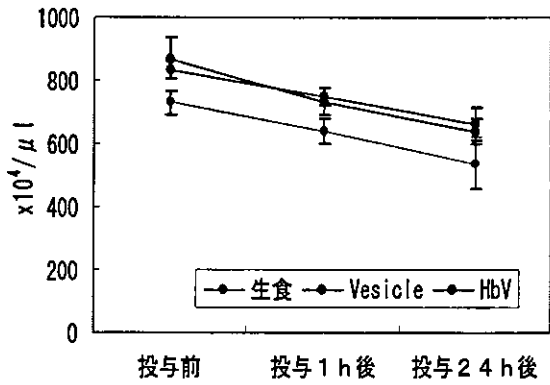


Fig. 2 RBC

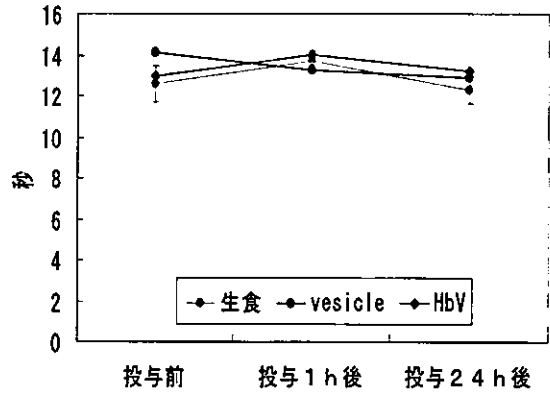


Fig. 6 PT

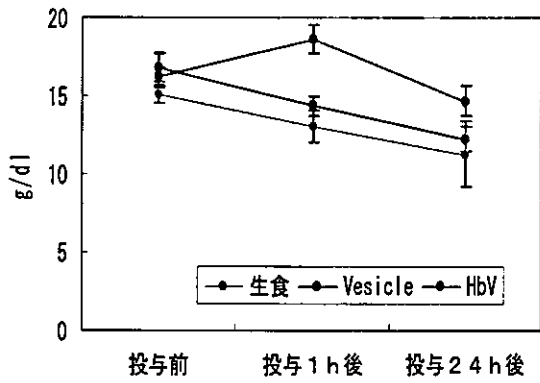


Fig. 3 Hb

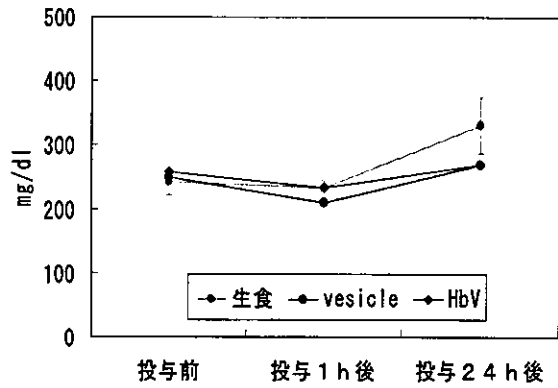


Fig.7 纤维蛋白原

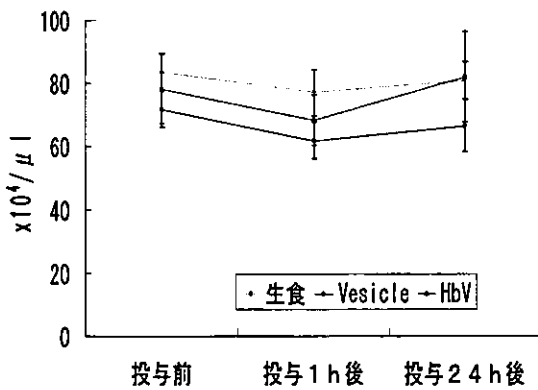


Fig. 4 PLT

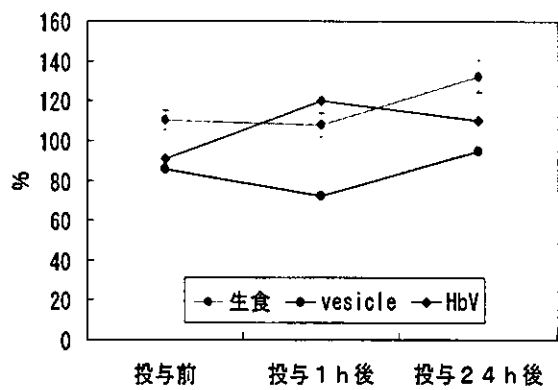


Fig. 8 AT

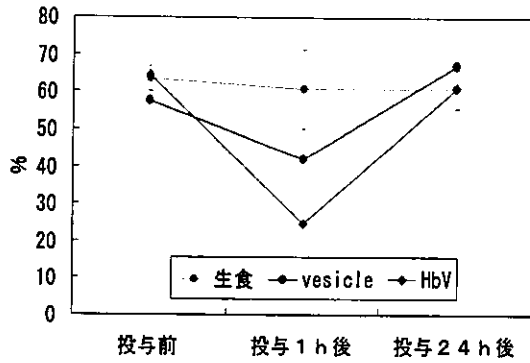


Fig. 9 vWF 抗原

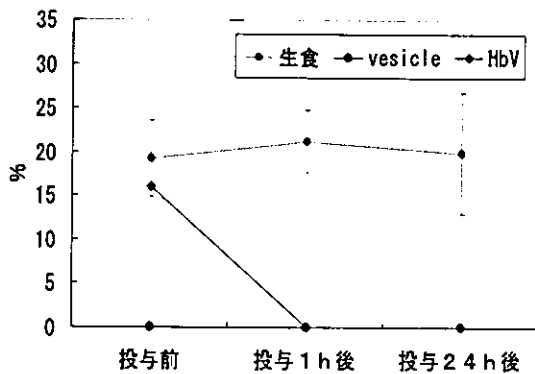


Fig. 10 vWF 活性

Table 2 血中 TAT の測定結果

	投与前	投与1h後	投与24h後
生食	1.0以下	1.0以下	1.1
	1.0以下	3.1	1.0以下
	1.0以下	1.0以下	1.0以下
	1.0以下	1.0以下	1.0以下
	1.0以下	1.0以下	1.0以下
Vesicle	1.0以下	1.1	1.0以下
	1.0以下	1.0以下	1.0以下
HbV	1.0以下	1.4	1.0以下
	1.0以下	1.0以下	1.0以下

凝固系ではAPTT, PT, ATⅢには影響はみられず、フィブリノゲンでは投与24時間後に若干の増加が見られた (Fig. 5-8)。しかしこれは生食でも観察され、脱血による影響と考えられた。

vWF活性、抗原については空球小胞体、Hb小胞体投与1時間後に低下傾向が見られた (Fig. 9,10)。

TAT (Table 2, FDPの上昇は見られなかった。

D. 考案

Hb小胞体はその性質上、血液学的検査値や凝固学的所見に影響を与える可能性があり、安全性評価の観点からこれらを検証することは甚だ重要である。昨年までのin vitroの検討で、(1) Hb小胞体は通常の凝固検査への影響は少ないが, lasminogen, α2-antiplasmin, 凝固X因子, 凝固XII因子など、一部の発色基質を用いた検査に影響すること、比濁法を用いた方法(ATⅢ)では異常高値となる可能性があることが示唆された。これらの検査が、Hb小胞体を使用される状況(ショックやDIC)ではしばしば用いられる検査であり、検査値の解釈に重要な知見を与えると同時にサンプリング法や測定法の改良の必要性を示唆した。今年度の研究により、下記が明らかとなった。

血球数の変動

- ・WBC、RBCは投与1時間、24時間後で減少傾向が見られたがこれは採血時の脱血による影響であり、Hb小胞体投与による影響は殆どないと考えられる。

- ・Hb濃度についてHb小胞体投与時では投与1時間後に2g/dlほどの上昇傾向が見られたが、この値は測定上(Sysmex KX-4500)の問題であると考えられる(RBC値、Hct値測定方法の検討より)。

- ・PLTに関しては投与後の経時的変化は見られなかった。

凝固検査について

- ・APTT、PT、AT、TAT、FDP、PAI-1ではHb小胞体投与による影響は見られなかった。

- ・フィブリノゲンでは投与24時間後に若干の増加が見られたが、これは生食でも観察され、脱血による影響と考える。

- ・vWF活性、抗原については空球小胞体、Hb小胞体投与1時間後に低下傾向が見られた。血漿中に浮

遊している空球小胞体、Hb 小胞体が測定上に影響を及ぼす可能性が考えられた。

出血時間について

空球小胞体、Hb 小胞体投与時の出血時間と生食投与時の出血時間の平均時間に差が見られなかったため、影響はないと考える。

E. 結論

人工赤血球の安全性評価を目的として Hb 小胞体を正常ラットに投与した。測定可能な範囲では血液学的（赤血球、白血球、血小板）、凝固学的（出血時間、凝固時間、過凝固状態評価）に大きな変化は見られなかった。Hb 小胞体は一部の検査値に干渉を与える為、実際の臨床の場で注意が必要であり、検査法に考慮すべきである。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. matsubara, M. Murata, T. Hayashi, K. Suzuki, Y. Okamura, M. Handa, H. Ishihara, T. Shibano, Y. Ikeda. Platelet glycoprotein I b alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow consitions. *Briti. J Haematol.*, **128**, 533-539 (2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

分担研究報告書

人工赤血球の安全性向上に関する研究

分担課題：Hb 小胞体が血管透過性に与える影響

分担研究者 合田 亘人 慶應義塾大学医学部 医化学教室 専任講師

研究協力者 梶村 真弓 慶應義塾大学医学部 医化学教室 助手

研究要旨

Hb 小胞体が局所血管透過性に与える影響を解析するためにマウス個体を用いた適切な *in vivo* 実験系の確立を行った。8-11 週齢の雄性 C57BL/6 の大腿静脈より Hb を内包しない空球の小胞体 (5 ml/kg) を前投与し、その後両側総頸動脈を結紮し 1 時間脳虚血状態を作成した。再灌流直後に Evans blue (EB:50 mg/kg) を投与し、その後 4 時間再灌流を行った。虚血・再灌流後の組織血管透過性の評価を行うために、脳、肝臓、腎臓、肺の各臓器を摘出後組織に漏出した EB を定量した。その結果、虚血・再灌流 4 時間の脳組織は非処置群と比較して著明な EB の蓄積 (7.5 ± 0.5 ngEB/mg brain) を認めた。一方、小胞体投与群では 4.8 ± 0.6 ngEB/mg brain と EB の脳組織蓄積量は有意に減少した。また小胞体投与によるこの血管透過性変化は解析した他臓器では認められなかった。以上の結果は、小胞体自身が血管透過性亢進を惹起しうる局所血管障害を抑制する付加的な機能を有していることを示していると考えられた。

A. 研究目的

Hb 小胞体は末梢臓器の隅々まで酸素を効率よく運搬することを主眼におき開発され、これまでにその生体投与に関する有効性と安全性について様々な角度より検討がなされてきた。しかし、一方で投与された Hb 小胞体が存在する血管内の動態に関する知見については詳細に検討されておらず、開発されてきた小胞体自体の特性、特に血管内皮細胞機能に対する影響についての解析の必要性が出てきた。そこで本年度は、内皮機能の中で最も重要な機能である局所血管透過性に与える小胞体の影響を解析することを目的とした。

B. 研究方法

8-11 週齢の C57/BL6 雄性マウスを使用し、 α -chloralose (60 mg/kg) および urethane (600 mg/kg)

を腹腔内投与し麻酔後、気道確保のために気管切開を行った。大腿静脈にカニューレシオン後 Hb を内包していない空球の小胞体 (5 ml/kg) を投与し、その後両側総頸動脈を結紮し 1 時間血流を遮断した。再灌流直後に Evans blue (EB: 50 mg/kg) を投与し、その後 4 時間再灌流を行った。EB は血液中ではそのほとんどがアルブミンと結合した状態であることが知られている。そこで、虚血・再灌流障害による局所血管透過性変化を評価するために各臓器に蓄積した EB の定量を次の方法にて行った (改変 Miles assay 法)。4 時間の再灌流後、37°C に温めた 100 mM クエン酸溶液 (pH 3.5) を 12 ml/min で 3 分間心臓より灌流した。その後、各臓器を摘出しその湿重量を測定した。350 mg の各臓器を 0.5 ml フォルマミド溶液に浸し、その後 55°C の振盪恒温槽中に一晩放置することで組織に