

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：H17-医薬-074)

平成 17 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 18 (2006) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	1～5
小林 紘一（慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 小林 紘一（慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授）	6～16
2. 池田 久實（北海道赤十字血液センター 所長）	17～25
3. 小田切 優樹（熊本大学大学院 医学薬学研究部 教授）	26～33
4. 村田 満（慶應義塾大学 医学部 臨床検査医学 教授）	34～40
5. 合田 亘人（慶應義塾大学 医学部 医化学教室 講師）	41～46
6. 高折 益彦（東宝塚さとう病院 名誉院長 / 川崎医大名誉教授）	47～48
7. 土田 英俊（早稲田大学 理工学総合研究センター 顧問研究員 / 早大名誉教授）	49～64
8. 甲斐 俊哉（ニプロ(株) 医薬品研究所 製剤研究室 室長）	65～66
9. 須賀 裕子（(株)オキシジェニクス 京都研究所 主席研究員）	67～69
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	70～78
IV. 研究成果の刊行物・別冊	79

人工赤血球の安全性向上に関する研究

主任研究者 小林 絃一 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(HbV, 平均粒径 250 nm)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。

平成17年度は、HbV 製造に関わる基本的留意事項を策定、学会誌で報告した。製造面ではスケールアップを行い、6L バッチの製造、検定が可能となり、大量製造工程の確立に必要な脱 CO 工程も解決法が示された。HbV の物性面の研究では、HbV を使用する際に併用すべき血漿増量剤について検討し、*in vitro* では溶液粘度が増大する場合もあり *in vivo* での検討が必要であると考えられた。また、一酸化窒素の配位結合反応は HbV で顕著に遅いことが特徴であった。

動物試験では、抗原特異的免疫機構が HbV 投与急性期には非特異的細胞性免疫機構と同様に一過性に抑制された。造血機能に対する影響を培養系で検討したところ、HbV との接触時間、濃度により造血が抑制される条件が存在したが、接触を解除すると回復した。血液型の判定に対する影響は殆ど無いことが明らかとなった。代謝動態の解析では、細網内皮系に捕捉されるまでに HbV は分解されず、細網内皮系細胞に貪食され代謝された後、蛋白分画は尿中へ、脂質分画は胆汁に分泌されて糞便中に排泄されると考えられた。血液検査法について、血液凝固線溶系の検査を正確に行うには、フィルター処理や超遠心分離によって HbV を除去する方法が有用であった。HbV が肝代謝に与える影響をメタボローム解析したところ、肝内のエネルギーの一過性の急激な消費と、抗酸化作用を有するアミノは酸代謝産物が急激に低下することが認められたが、7日間で回復した。HbV は側脳室内に注入された場合、血液の注入に比較して行動学的影響は認めず、脳実質では速やかに分解される事が明らかとなった。代謝臓器として重要な脾臓の微小循環は血流の一過性の低下を認めるが、3日後には回復した。代謝臓器として脾臓を温存した Beagle 犬を用いた 50%脱血ショック蘇生モデルの検討で、蘇生に関しては自己血と同等の効果と安全性が示された。今後長期間生存後の臓器機能の検討が必要である。

人工赤血球が効果の高い物質であることは重要であるが、安全性が高く、どのような状況下でも使用可能で副作用が少ないことが臨床応用の上で必須の要素である。第一期(平成15～17年度)に実施した安全性の研究により、HbV の特性(効果)と安全性について多面的に検討が進んだ。今後、開発研究を行う際に医薬品としての条件を満たすことは勿論、使用後遠隔期の影響、安全性についての検討が必要である。第二期(平成18～20年度)「血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究」(申請中)では、臨床治験の実施と並行・連動して問題点を解決、人工赤血球の効果と安全性を明らかにできる評価方法などについて検討する必要がある。

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	教授
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 / 川崎医大名誉教授
土田 英俊	早稲田大学 理工学総合研究センター	顧問研究員 / 早大名誉教授
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。平成 15～16 年度には HbV の物性規格を決定、製造技術・工程を確立し、平成 17 年度では委託製造により均質で比較的大量の試料が得られるようになり、研究が進展した。

平成 17 年度の研究項目は、①人工赤血球の安全性評価、治験計画の作成に必要な製造に関わる基本的留意事項の作成。②HbV の大量製造へ向けて効率の高い脱 CO 装置を開発する。GMP 製造のための HbV の大量調整法の開発と安定化。③HbV の物性に関し、臨床で用いられる血漿増量剤と HbV 分散液との相互作用についての検討と HbV の一酸化窒素(NO)、一酸化炭素(CO) 結合速度を定量し、分子状の修飾 Hb と比較して機能の相違を解析する。④動物および比と血液を用いた *in vitro*、*in vivo* での HbV の安全性の検討(a. 免疫系に及ぼす影響、b. HbV がヒト造血前駆細胞のコロニー形成に与える影響、c. HbV が血液型判定に及ぼす影響、d. 体内動態の特性(構成成分の体内動態特性の解析)、e. 血液凝固・線溶系に与える影響(HbV が凝固系検査、生化学的検査に与える影響)、f. キャピラリー電気泳動-質量分析手法を用いた HbV 投与後の組織内代謝動態特性への影響についての検討、g. HbV の

脳神経組織への影響、h. HbV 投与時の脾臓微小循環動態の計測、i. ビーグル犬を用いた 50%脱血ショックにおける HbV の蘇生効果(脾摘をしないモデルを用いて)である。

B. 研究方法

平成 16 年度に HbV の安定供給のためラボスケール(3 L バッチ)での製造技術の確立を行い、製造した HbV 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が、平成 17 年度はスケールアップを行い、6 L バッチでの製造と GMP 製造のための技術開発を行う。また、大量調製時に効率よく脱 CO を行うための装置を開発する。

日本救急医学会の評議員にアンケートを送り、輸血に関する現状と人工赤血球に望まれる物性を調査し、HbV の製造に関わる基本的留意事項について血液代替物学会の代表者も含めて検討し策定する。

HbV の物性の検討について以下の方法で検討した。血漿増量剤(デキストラン、ヒドロキシエチルスターチ、修正ゼラチン)溶液に HbV を混和し、HbV 分散液の粘弾性挙動をキャピラリーレオメーターにて検討した。また、分子状 Hb 溶液と細胞型 HbV の NO と CO に対する結合速度の違いを明らかにするため、分子状 Hb 溶液(Hb-PLP、PolyHb)

と HbV について、ストップフローラピッドスキヤン分光測定装置により解析した。

動物投与試験による安全性の検討には、以下の方法を用いた。

a. 免疫系に及ぼす影響として HbV の投与が抗原特異的な免疫応答に与える影響を Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) で免疫したラットを用いて検討した。KLH 免疫ラットに HbV を投与し、6 時間後に脾細胞を分離、KLH に対する二次応答をフローサイトメトリーにて解析した。b. HbV が造血機能に与える影響を臍帯血由来の単核球を用いた *in vitro* コロニーアッセイ系で検討した。c. HbV を投与した患者の血液型判定に HbV が影響を及ぼすかについて、血液型既知の抗凝固剤添加血液に HbV を混じた検体を用いて現行の血液型判定を行って検討した。d. HbV の成分別に体内動態を調べるため、Hb 分子を ^{125}I 標識した ^{125}I 標識 HbV、また脂質分画を ^3H 標識した ^3H 標識 HbV を作成した。ddY マウスに投与し、経時的に採血、 ^{125}I の場合はガンマカウンターで放射活性を計測、また、犠牲死させて臓器を採取、放射活性を測定して臓器クリアランスを算出した。Tritium の場合は液体シンチレーションカウンターを使用した。e. HbV を *in vitro* で血液に混じり一旦凍結した後に生化学検査、凝固学的検査を行った。また、血清あるいは血漿分離後フィルター(0.1 μm)通過あるいは超遠心し、上清を同様に検査に供した。f. HbV の投与により肝臓を代表とする臓器の代謝に変動を与えると予想される。この変動をキャピラリー電気泳動-質量分析手法を用いたメタボローム解析にて測定し、低分子量代謝産物の変動から代謝機能の変動を検討することとした。g. Wistar 系ラットを用い脳虚血を作成、HbV が血液脳関門を通過して脳実質に漏出するかについて脳を摘出して免疫組織学的に評価した。更に、定位脳手術の手法を用いて HbV(20 μl)を側脳室に注入、運動機能の変化および犠牲死後の病理を検討した。h. Wistar ラットを用い

HbV(20ml/kg)を尾静脈より投与し、投与 1, 2, 3 日後にレーザードップラー血流計を用いて脾臓微小循環を計測、計測後犠牲死させて脾臓の微小循環を病理学的に検索した。i. ビーグル犬を用いる出血性ショック蘇生試験について、昨年度は脾臓の収縮による出血性ショックに対する自己調節機能を除去して HbV の効果と安全性を検討するため脾摘を行った。脾臓は HbV の主要な代謝臓器であるため脾摘により HbV の代謝が遅くなり、蘇生に影響を与えている可能性が示唆されたため、本年度は脾摘を行わずに 50%脱血ショックにおける HbV の蘇生効果と安全性を検討した。

C. 研究結果および考察

救急医学会のコアメンバーである評議員にアンケートを送り、緊急輸血の実態、HbV の人工赤血球としての考え方と取り組み、期待する物性などについて調査し、74 施設から回答が得られ、血液型に関わらず使用できる感染症の可能性がほとんどない点で大きな期待が寄せられた。また、現在の緊急輸血の 51.5%が 1000mL 以下の輸血量であることから、HbV が使用される可能性が示唆された。更に HbV の機能維持時間についても要望の 77.1%に対応できることが明らかとなった。日本血液代替物学会総会ならびにパネルディスカッション、評議員会で討議を重ね、人工酸素運搬体製造に関わる基本的留意事項が策定された。今後の開発、臨床治験に指針として有用であると考えられた。

脱 CO はラボスケールではフラスコを用いて薄膜を作り、これに可視光を照射する操作を採用していたが、HbV の大量製造へ向け、膜型ダイアライザーとランプを用いた脱 CO 装置を新規に開発し、10 回のパスで 96%の HbV を脱 CO 化し酸素化することが可能となった。モジュール数を変更することにより大量調製が容易となることも確認し GMP 調製に対応した方法を開発できたと考えられた。

Dextran40 (Mw 40,000)、HES200 (MW20,000)、Gelofusin (Mw. 3,000)に HbV を分散させると粘性項および弾性項は顕著に高くなり、Dex40 では光学顕微鏡でも凝集を認めた。しかし、HES70 (Mw. 7,000)、5%rHSA (Mw. 69,000)に HbV を分散させた場合には粘弾性は血液とほぼ同等であった。これらの結果から、HbV を使用する際に同時使用すべき血漿増量剤について *in vivo* での検討も行う必要があると考えられた。

動物および比と血液を用いた *in vitro*、*in vivo* での HbV の安全性の検討では、

a. 免疫系に及ぼす影響では、ラット脾細胞は KLH 感作に対する抗原特異的免疫応答が HbV 投与により急性期では反応の低下を招くことが示された。抗原特異的免疫を獲得している固体に使用してもアナフィラキシー用の症状が発現する可能性はなく、安全に投与できることが予想された。しかし、HbV 投与によって低下した非特異的免疫応答、あるいは特異的免疫応答が HbV 投与後遠隔期にどのように修飾されるかについて検討する必要があると考えられた。b. 造血機能に与える影響について、臍帯血由来の幹細胞を用いて行った検討では、HbV の濃度に依存して High proliferative potential-colony forming unit(HPP-CFC)が抑制された。この結果は液体培養系、ストローマ細胞との共培養系でも同様であった。しかし、HbV との接触を3日間とし、その後培養を続けると HPP-CFC の形成抑制は僅かであった。この結果は、HbV の半減期がヒトで72時間程度と予想されることから、HbV 投与によって骨髓機能に強い抑制がかかるとは考えられなかった。この点も臨床に即した動物モデルで検証し、安全性を検証してゆく必要があると考えられた。c. HbV は PEG で修飾されており、通常の遠心分離では沈降せずに血清層に分散しているため、血液型判定に影響を及ぼす可能性があったが、通常の方法で表試験、裏試験ともに血液型判定に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

救急の現場で HbV を使用した後でも正しい血液型を通常の方法で判定でき、臨床応用に当たり必須の知見と考えられた。d. HbV の構成成分の体内動態では血中濃度は³H 標識の HbV も¹²⁵I 標識の HbV も血漿中の濃度に違いはなく、HbV は血流中で分解されずに細網内皮系へ取り込まれることが明らかとなった。主たる代謝臓器は肝と脾で、それぞれの臓器のマクロファージに取り込まれ、代謝されるが、蛋白質である Hb 分子と脂質膜成分は異なった経路で代謝されることが明らかとなった。即ち、Hb 分子は尿中に7日までに75%が排泄される形で代謝され、脂質膜成分は70%以上が糞中に排泄された。脂質膜成分は胆汁中に分泌され、糞便中に排泄されると考えられた。e. HbV は血清層あるいは血漿層に浮遊し、混濁しているため、比色法や比濁法を用いる検査では干渉作用が認められたが、フィルター処理あるいは超遠心による HbV の分離操作を行うことにより、干渉作用を回避できた。しかし、フィルター処理では中性脂肪がフィルターに沈着するため、検査結果が低値となり、中性脂肪の測定で前処置は不要であった。f. マウス肝臓における代謝変動では TCA 回路中のフマル酸、りんご酸が HbV 投与後7日目まで上昇し、N-アセチルグルタミン酸が低下、解糖系代謝産物すべてが低下していた。陽イオン系代謝産物としてはグリシン、タウリン、ヒポタウリン、還元型グルタチオンの低下が認められた。ヌクレオチド・CoA 体代謝物では AMP, GMP の一過性上昇、UDP, GDP の一過性低下、ATP, GTP, UTP の投与1~3日目にかけての減少が認められた。ADP/ATP 比は1日後に急激な上昇を認めた。以上より、HbV の投与は肝臓内のエネルギーの一過性の急激な消費と抗酸化作用を有するアミノ酸代謝産物の低下が惹起されるものの、それ以外では肝代謝系に大きな影響を与えないものと考えられた。g. 出血性ショック状態に脳虚血を合併する状態でも、HbV は血液脳関門を通過しないことが明らかとなった。また、脳室内に HbV を注入するモデルでは行動学的

検討では大きな変化はきたさず、脳室内で速やかに分解されることが明らかとなった。病理学的検索ではヘモジデリンの沈着が認められた。h. HbV 投与により脾臓血流は低下するが、投与 3 日後までに正常値に復した。3 日後は脾臓の腫大が最も著しいが、この時期にも脾臓血流は保たれていた。以上より HbV 投与は脾臓の細網内皮系を活性化させるが、微小循環では投与直後で血流低下を認め、時間とともに正常化することが明らかであった。i. 脾摘をしない Beagle 犬を用いた 50% 脱血ショックにおける HbV の蘇生効果は脾摘をした場合と殆ど同じ経過をたどり、脾臓の有無による代謝産物の影響はショック蘇生に影響を与えるものではないと考えられた。

D 結論

平成 17 年度の研究の結果、HbV 製造に関わる基本的留意事項を明らかとすることができ、学会誌で報告した。製造面ではスケールアップを行い、6 L バッチの製造、検定が可能となり、大量製造に必要な脱 CO 技術も解決法が示された。物性面の研究では HbV を使用する際に同時使用すべき血漿増量剤について検討し *in vitro* では粘度の上昇する場合もあり、*in vivo* での検討が必要であると考えられた。動物試験では、抗原特異的免疫機構が HbV 投与急性期には非特異的細胞性免疫機構と同様に抑制されることが明らかとなった。造血機能に対する影響を培養系で検討したところ、HbV との接触時間、濃度により造血が抑制される条件が認められた。血液型の判定に対する影響は殆ど無いことが明らかとなった。代謝動態の解析では細網内皮系に捕捉されるまでに HbV が分解することは無いことが

明らかとなり、蛋白質分画は代謝されて尿中へ、脂質分画は胆汁に分泌されて糞便中に排泄されると考えられた。血液凝固線溶系の臨床検査を正確に行うために、フィルター処理が有用であると考えられた。HbV が肝代謝に与える影響をメタボローム解析したところ、肝内のエネルギーの一過性の急激な消費と抗酸化作用を有するアミノは酸代謝産物が急激に低下することが認められたが、7 日間で回復することも明らかとなった。HbV を側脳室内に注入した場合、行動学的に影響は認めず、側脳室内では速やかに分解される事が明らかとなった。また、代謝臓器として重要な脾臓の微小循環は血流の一過性の低下を認めたが、組織病理学的には捕捉された HbV が確認される以外、微小血管系に異常は無かった。Beagle 犬を用いた 50% 脱血ショック蘇生モデルの検討では、蘇生に関して自己血と同等の効果と安全性が HbV で示され、今後は長期間生存後の臓器の状態等の検討が必要である。

人工赤血球が酸素運搬効果の高い物質であることは重要であるが、同時に、安全性が高く、どのような状況下でも使用可能で、副作用が少ないことが臨床応用の上で必須の要素である。平成 17 年度は第一期(平成 15~17 年度)の最終年度として安全性を多方面から解析し、検討することができた。次期研究(平成 18~20 年度)は、「血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究」(申請中)では、臨床治験の実施と並行・連動して問題点を解決、人工赤血球の効果と安全性を明らかにできる評価方法などについて検討する必要がある。

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：ビーグル犬を用いた 50%脱血ショックにおける Hb 小胞体の蘇生効果
および酸素運搬能の評価

主任研究者 小林 紘一 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授

研究協力者 堀之内 宏久 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 講師

池田 達彦 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 助手

研究要旨

Hb 小胞体(HbV)の臨床応用を考えた場合の安全性と効果を検証するため、ビーグル犬を用いて 50%出血ショックモデルを作成し、HbV を用いた蘇生実験を行った。蘇生液として HbV を 5%リコンビナントアルブミン生理食塩水溶液(rHSA)に分散した液体 (HbV/rHSA 分散液)、5% rHSA 溶液単独の溶液、および脱血血液を用い、投与の効果、安全性について検証した。犬では脾臓が出血時に収縮し、脾臓内の血液が循環血液内に押し出され、血液の貯蔵庫としての機能を担っているため、H16 年度は実験開始前に脾臓摘出を行っていた。しかし H17 年度は代謝臓器としての脾臓の機能も考慮し、蘇生液の安全性の評価のため脾臓は摘出しなかった。脾臓を摘出しなくても HbV/rHSA 分散液は rHSA 溶液、脱血血液と同様の蘇生効果を示した。循環動態に与える影響では、アルブミン群では平均動脈圧が低く推移する傾向があった。酸素運搬は 24~27%が HbV で分担されており、酸素運搬も十分に行われていると考えられた。中動物を用いた投与後急性期の実験での安全性を確認することができた。

A. 研究目的

人工赤血球の臨床応用最も期待されている出血性ショックに対する治療効果と安全性を確認するため、平成 15 年度は評価のためのモデルを確立、平成 16 年度は脾摘、50%脱血ショックモデルを用いて検討を行い HbV が自己血と同等の蘇生効果を持ち安全性が高いことを証明した。

脾臓は HbV の主要な代謝臓器であり、脾摘を行って代謝機能の一部を除去することによって安全性が高まった可能性も指摘されたので、本年度は脾摘を行わずに 50%脱血ショックモデルを用いて HbV の効果と安全性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

月齢 6 ヶ月のビーグル犬を用い、ケタラールで基礎麻酔を行い、気管内挿管を行った後、セボフルレン 2%の吸入麻酔により全身麻酔とした。一回換気量を 150 ml、呼吸回数を 15 回として状態を安定させた。犬では、脾臓が出血時に収縮し、脾臓内の血液が循環血液内に押し出され、血液の貯蔵庫としての機能を担っている。そのため昨年度は実験開始前に脾臓摘出を行っていたが、今回は代謝臓器としての脾臓の機能を考慮し、脾摘は行わなかった。小開腹にて左腎皮質に酸素分圧を測定する電極を留置した。酸素分圧測定のための不感電極は腹腔内に留置した。右大腿動脈に動脈圧モニター用のカテーテ

ルを挿入、左大腿動脈に脱血用のカニューレを挿入した。左前肢に静脈ラインをとり、薬物の投与経路とした。循環系諸標を測定するために日本光電社製 Laboratory Polygraph System D120H を用いた。また、6Fr Thermodilution catheter (Baxter 社製、631HF55) を使用し、Vigilance II を用いて心拍出量を間歇的に測定するとともに混合静脈血酸素飽和度を連続的に測定した。腎皮質の酸素分圧は Polarography 法 (Intermedical 社製) により連続的に計測した。大脳皮質、腹直筋の組織血流内酸素飽和度を NIRA 法 (Somanetics 製、SPFB) により連続測定、記録した。

計測のための機器を装着し、状態が安定化した後に体重から次式を用いて求めた循環血液量の 50% 相当量を 20 ml/min の速度で脱血した。

脱血に従い血圧の低下を認め、50 mmHg 以下となるのを確認した後、60 分間にわたり収縮期血圧が 50 mmHg を上回らないように維持した。50mmHg を上回る際には 50 mmHg 以下になるように脱血を行なった。

脱血ショック状態を 1 時間継続した後、25%アルブミン生理食塩水溶液 (リコンビナントヒトアルブミン (rHSA、ニプロ社製) を生理的食塩水に 5% 濃度となるよう溶解した液体: rHSA 群)、脱血血液 (Autologus shed blood ASB 群)、HbV 分散液 (HbV を 5%アルブミン生理食塩水溶液に分散した液体。Hb 濃度は 8.6 g/dl : HbV/rHSA 群) を用いて蘇生を行った。蘇生は 20 ml/min のスピードで脱血量と同量の蘇生液を上肢の静脈ラインより経静脈的に投与した。

計測は脱血前、脱血直後、脱血 1 時間後、蘇生液投与直後、30 分後、60 分後、90 分後、120 分後 180 分後、240 分後に血圧、PAP、CVP、PCWP、CO、動脈血血液ガス、混合静脈血血液ガス、腎皮質酸素

飽和度、CBC、血液生化学、ヘマトクリットを測定した。

倫理的配慮: 実験プロトコールは慶應義塾大学医学部実験動物センターおよび動物実験委員会の承認を得て行なわれ、実験動物に関しては、十分な麻酔下にて実験を施行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

C. 結果および考察

1. 血圧、肺動脈圧、CVP、PCWP の変化 (Fig.1)

平均血圧は 3 群 (ASB 群、rHSA 群、HbV/rHSA 群) 間では有意差を認めなかった。平均肺動脈圧は 3 群とも蘇生後上昇し、脱血前値より高値で推移した。PCWP は脱血後低下し、蘇生後上昇し、脱血前値と有意差のない状態に復した。CVP の変化に 3 群間の有意差は認めなかった。

2. 心拍数、心拍出量、体血管抵抗、肺血管抵抗 (Fig. 2)

心拍数は脱血後上昇し、蘇生により脱血前値と同程度の値にまで復し、その後安定した経過を示した。心拍出量は出血ショックに伴い 0.2 /sec に低下したが蘇生に伴い脱血前値に復した。rHSA 群では overdose のため術前よりも高値で推移した。体血管抵抗 (SVR) は HbV/rHSA 群と ASB 群の間には有意差がなく、ほとんど同様の変化を示した。rHSA 群では蘇生後 SVR は低下したまま推移し、脱血前値との間に有意差を認めた。肺血管抵抗は HbV/rHSA 群にて脱血 60 分後に一時的に上昇を認めたが、投与後は 3 群間に有意差を認めなかった。

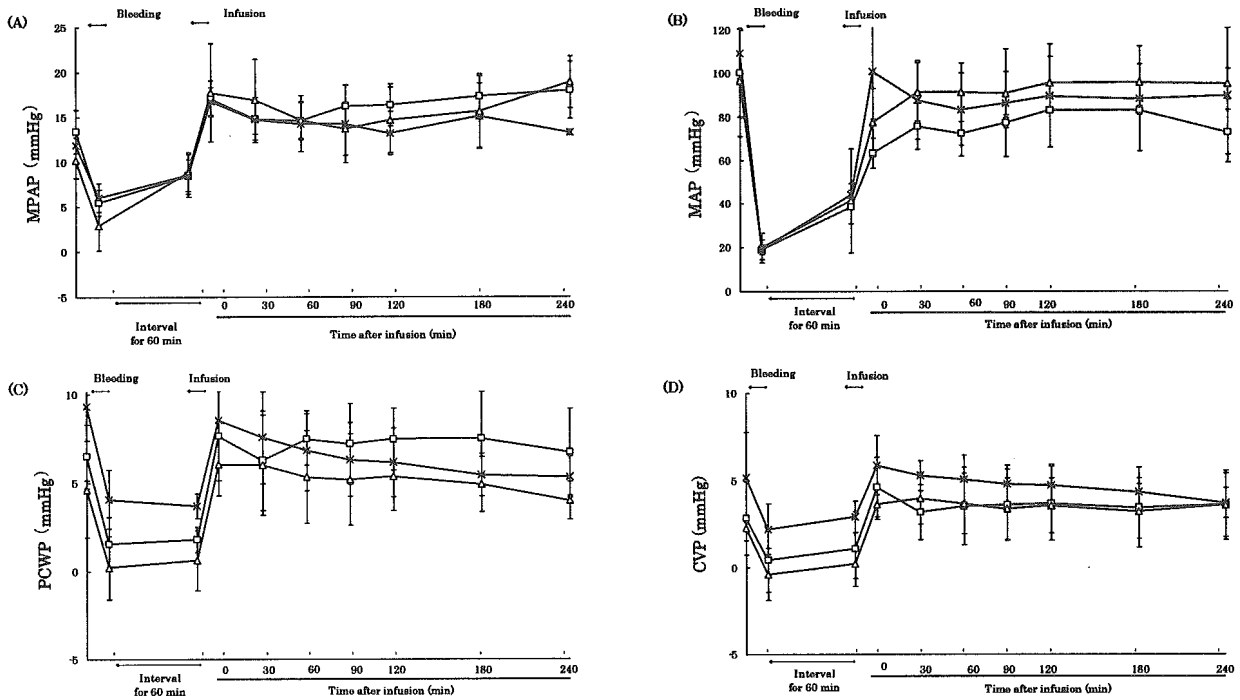


Fig. 1. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on mean pulmonary arterial pressure (MPAP) (A), mean arterial pressure (MAP) (B), pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) (C) and central venous pressure (CVP) (D) in anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (□; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group).

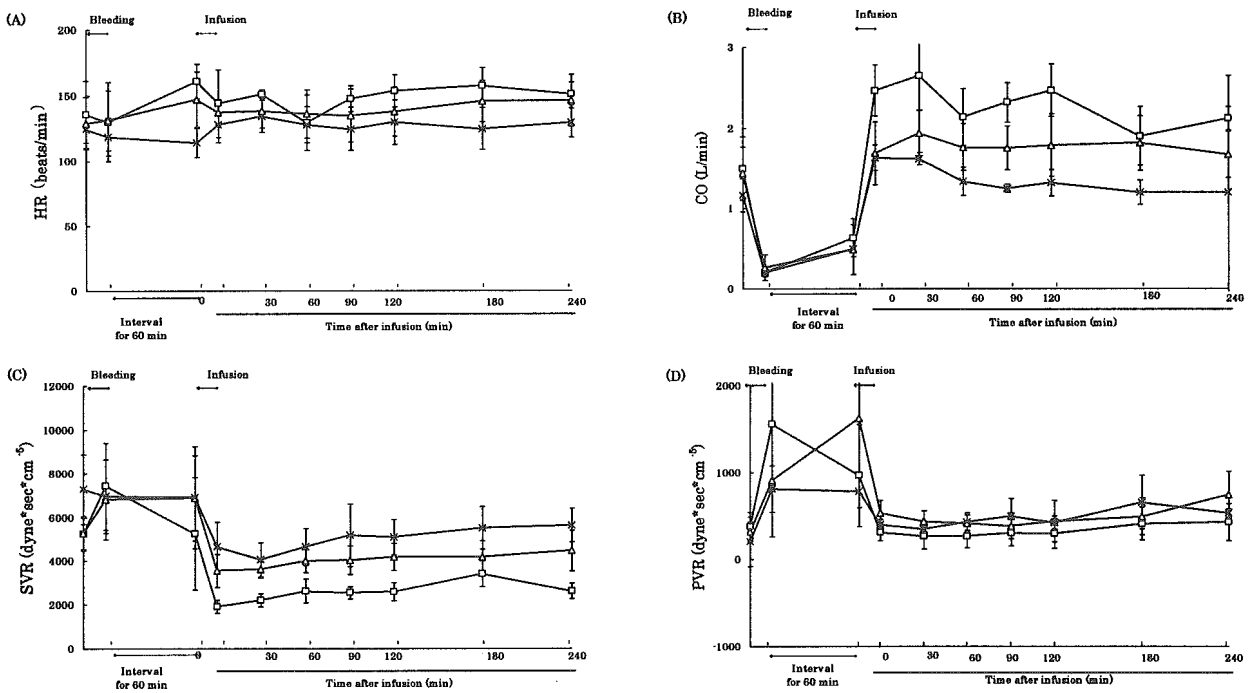


Fig. 2. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on heart rate (HR) (A), cardiac output (CO) (B), systemic vascular resistance (SVR) (C) and pulmonary vascular resistance (PVR) (D) in anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (□; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group)

3. 血液ガス所見 (Fig. 3)

動脈血酸素分圧は実験経過を通して全群で有意差を認めなかった。pHは出血性ショックとともに低下したが、蘇生により値は回復を示し、脱血前値と有意差を認めなかった。

腎皮質酸素分圧の推移では HbV/rHSA 群で、蘇生後 180 分後と 240 分後に腎皮質酸素分圧の上昇を認めた。

大脳皮質酸素分圧、腹直筋内血流酸素飽和度は全群間で有意差を認めなかった。

4. 腎組織酸素分圧、大脳皮質内血流酸素飽和度、腹直筋内血流酸素飽和度 (Fig. 4)

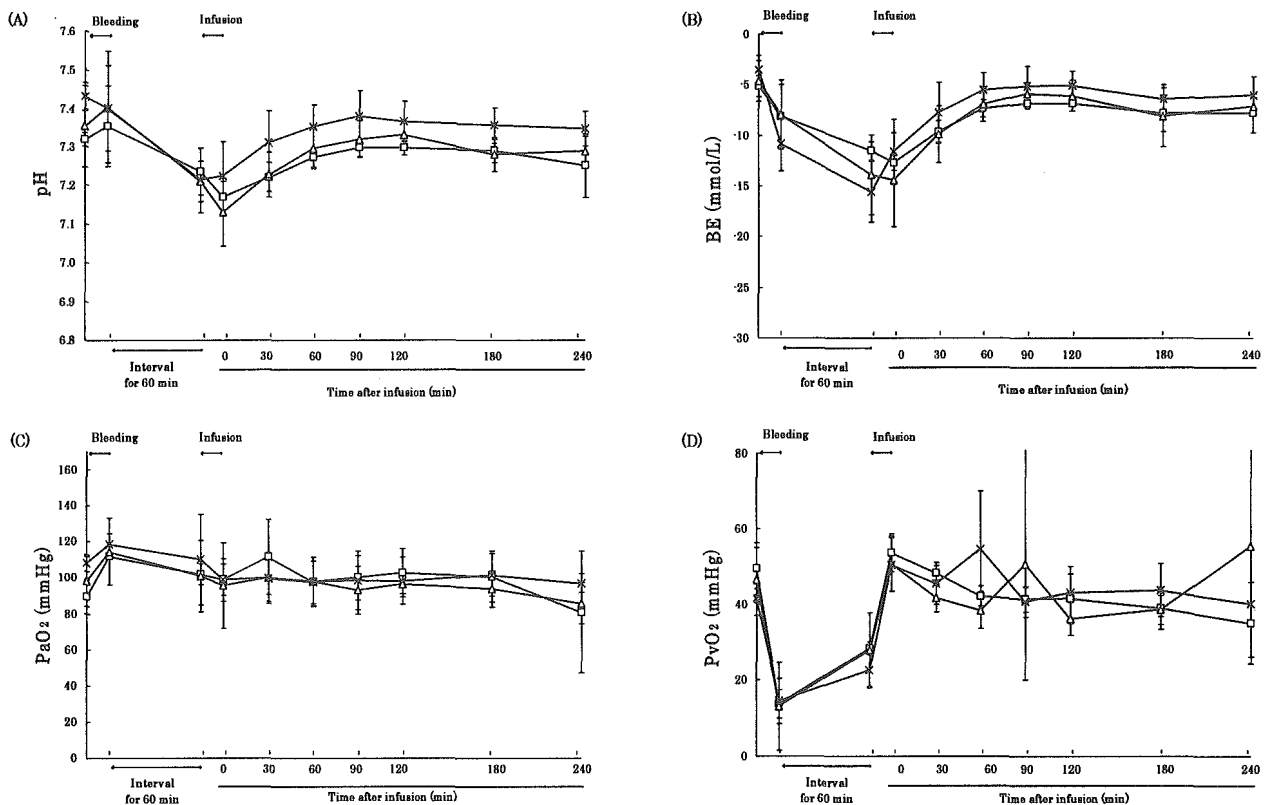


Fig. 3. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and hemoglobin vesicle (HbV/rHSA) on blood pH (A), base excess (BE) (B), arterial blood O₂-tension (PaO₂) (C) and venous blood O₂-tension (PvO₂) (D) in anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (□; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group).

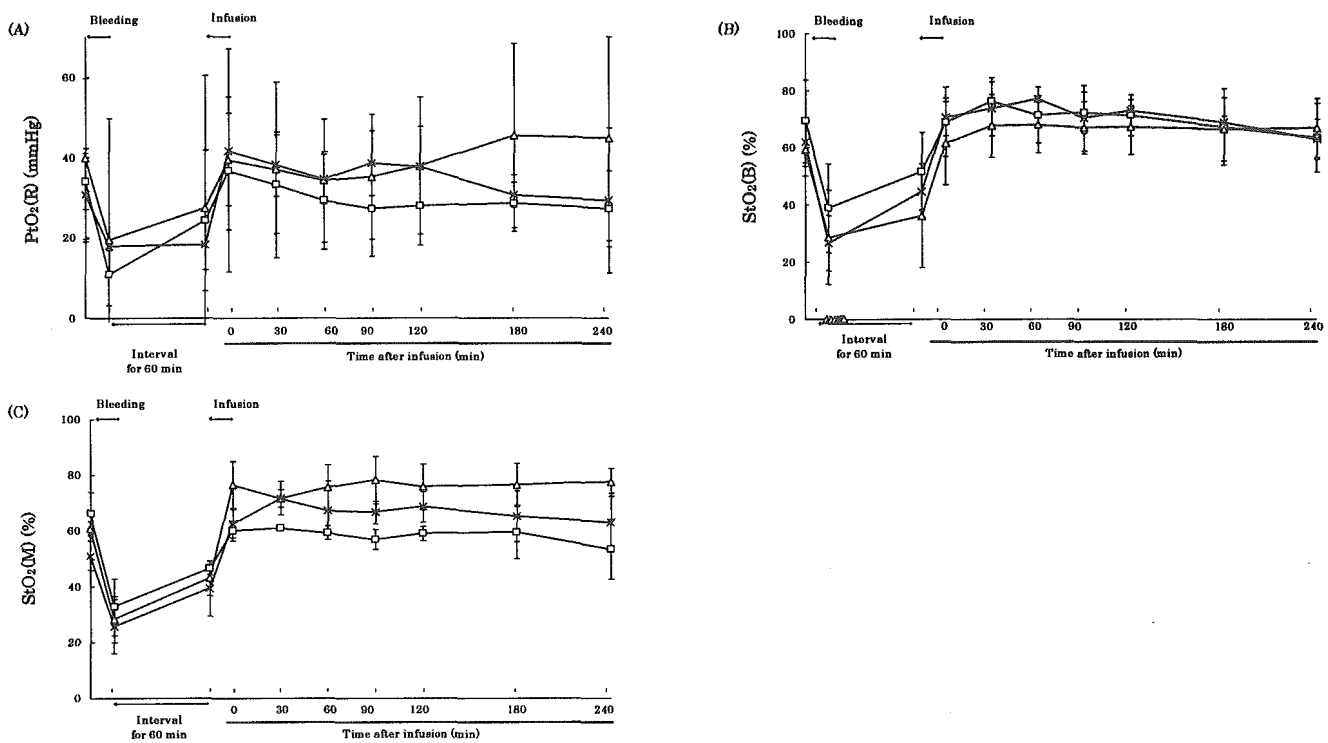


Fig. 4. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicle (HbV/rHSA) on renal cortex O₂-tension (PtO₂(R)) (A), brain O₂-saturation (StO₂(B)) (B) and rectus abdominis O₂-saturation (StO₂(M)) (C) in anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (□; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group).

5. 赤血球 Hb 濃度およびヘマトクリットの推移、Hb 小胞体による Hb 濃度の推移 (Fig. 5)

脱血ショックに伴いヘマトクリットは術前値の約 50%に低下した。ASB 群では蘇生後脱血前値に復した。HbV は通常の血球計数機では正確な評価ができないため、界面活性剤を加え、加温して小胞体膜を破壊したのち Hb 濃度を測定し、赤血球の Hb 濃度を加えた。その結果を Fig.5 (A')に示した。脱血後は循環血液量も減るため、Hb 濃度は脱血前値と有意差はないが、HbV を投与した後、赤血球の Hb 濃度は 6.7g/dl に低下し、その後は安定した経過を示した。脱血血液の平均 Hb 濃度は 12.2 g/dl であったのに対し、投与した HbV 溶液の Hb 濃度は 8.6g/dl とやや低いため、蘇生後の Hb 濃度のう

ち HbV の占める割合は約 35%であった。血中乳酸値は脱血ショックにて上昇したが、すべての群で蘇生により脱血ショック 60 分後のデータより改善を示した。

6. 酸素運搬量、酸素消費量 (Fig. 6 (A,B))

蘇生後の酸素運搬は各群で改善を示し全群間で有意差を認めなかった。

酸素消費量は脱血ショック後 40ml/min 以下に一時的に低下したが、蘇生により回復し、全ての群で有意差を認めなかった。

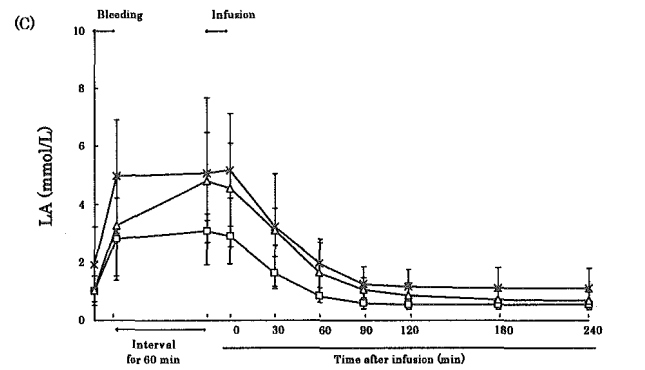
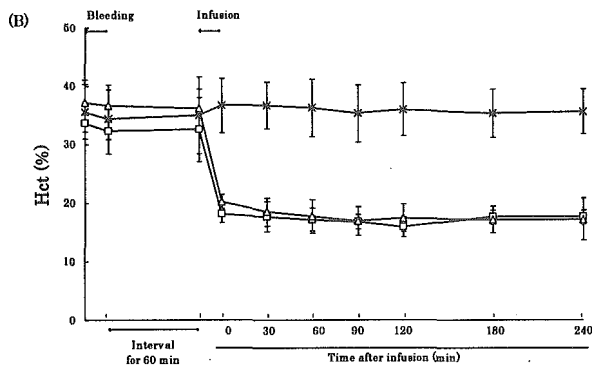
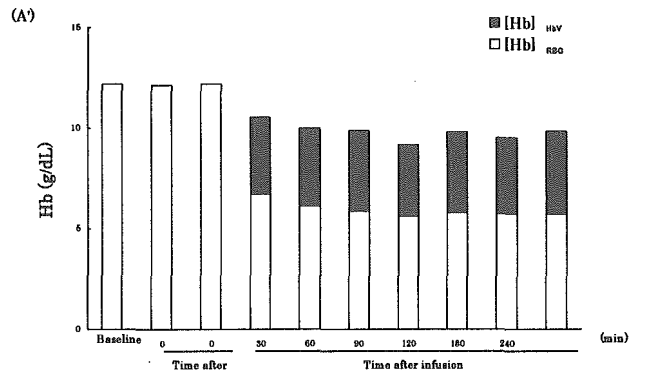
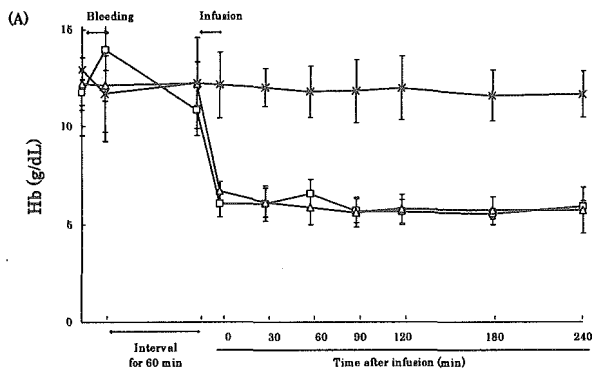


Fig. 5. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on hemoglobin (Hb) concentration (A), hematocrit (Hct) value (B) and lactic acid (LA) level (C) in whole blood of anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (□; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group)

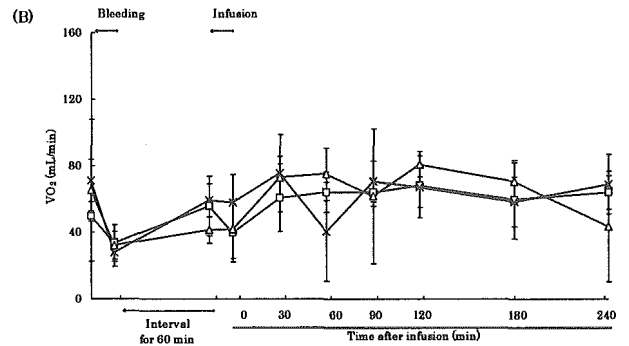
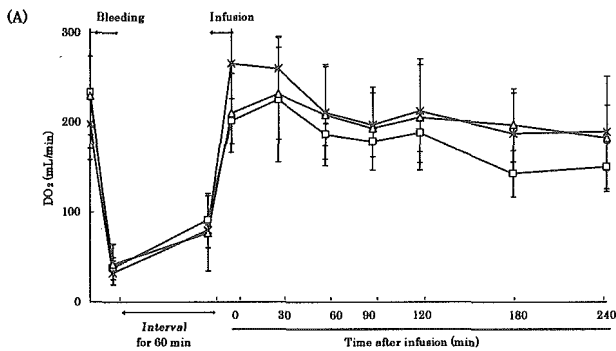


Fig. 6. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and hemoglobin vesicle (HbV/rHSA) on oxygen delivery (DO_2) (A), oxygen consumption (VO_2) (B). (□; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group).

7. Hb 小胞体の酸素運搬、酸素消費に占める役割(Hb 小胞体群における検討) (Fig. 7)

酸素運搬は出血ショックによる心拍出量の減少に伴い、baseline の 20 %以下に減少したが、HbV 分散液の輸注により速やかにショックを脱し酸素運搬も回復して baseline と同程度となった。このうち 24 から 27 %の O_2 を HbV が運搬していた。

一方酸素消費でもショック後酸素消費量が減少したが、その現象の程度は酸素運搬量に比較して軽度であった。HbV による蘇生後血圧が回復し、酸素消費も緩やかに回復した。30 分後からは baseline と有意差を認めなかった。蘇生後の酸素消費量の 20%から 23%の酸素を HbV が運搬していた。

D. 結論

昨年度に引き続きビーグル犬を用いて脱血ショックモデルを作成し、HbV/rHSA の有効性と安全性を検討した。今回はより臨床での使用に近い形を

想定し、また脾臓の代謝臓器としての機能も考慮して脾摘を行わないで脱血ショックモデルを作成した。循環動態の変化は脾摘を行った場合とほぼ同様であった。

50%脱血ショックの状態を蘇生するためにヘパリン化した出血血液(ASB 群)、リコンビナントアルブミンを生理食塩水に 5%溶解した溶液(rHSA 群)、HbV を rHSA に分散した溶液(HbV/rHSA 群)で比較を行った。蘇生液の投与量は出血量と同等とした。

臨床では、出血ショックの症例にはまず、晶質液を予想出血量の 2 倍から 3 倍量投与してショックより離脱させ、その後に輸血治療を考える場合が多いが、出血が明らかな場合、いたずらに晶質液を投与することは血液粘度が低下し、心負荷を増大させ、心筋の酸素需要を増やしてしまう。末梢組織の酸素代謝を改善するためにも酸素を運搬する物質を投与する必要がある。今回の条件では、rHSA 群でも蘇生後の酸素消費には大きな変化がなく、アルブミンによる蘇生効果が高いことが明ら

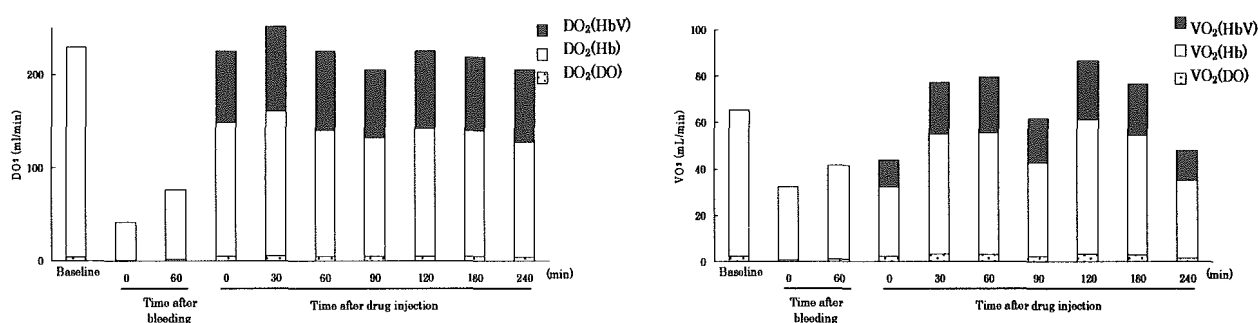


Fig. 7. Rate of HbV derived oxygen delivery ($DO_2(HbV)$), RBC derived oxygen delivery ($DO_2(Hb)$) and dissolved oxygen derived oxygen delivery ($DO_2(DO)$) in total oxygen delivery (DO_2) (A) and HbV derived oxygen consumption ($VO_2(HbV)$), Hb derived oxygen consumption ($VO_2(Hb)$) and dissolved oxygen derived oxygen consumption ($VO_2(DO)$) in total (VO_2) (B) in anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage followed by injection of HbV.

かとなり、一方、HbV/rHSA 群は ASB 群とほぼ同様の経過を示し、血液と同等の蘇生効果があることが明らかとなった。昨年度の脾摘を行ったモデルでは、HbV/rHSA 群では投与直後に肺動脈圧が有意に上昇し、HbV が NO(一酸化窒素)を一時的に吸着していることが考えられた。しかし今回の脾摘を行わないモデルでは 3 群間に有意差を認めず、いずれも脱血前より高値で推移した。NO の吸着が HbV に特異的に生じているのか等につき Hb を内包しない空の小胞体を投与する比較試験が今後必要である。

その他の全身状態については、肝、脾、腎機能等に血液生化学検査上は投与前後に著変なく、病理検査上も明らかな異常は指摘されていなかった。

このモデルは臨床現場で経験する出血の状況を模倣しているため、今後同モデルを用いた中、長期の生存実験を行い、安全性を確認することが重要になると考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Acute 40% exchange transfusion with Hb-vesicles (HbV) suspended in recombinant HSA solution: Degradation of HbV and erythropoiesis in rat spleen observed for 2 Weeks. *Transfusion* **46**, 339-347 (2006)
2. M. Sawafuji, A. Ishizaka, M. Kohno, H. Koh, S. Tasaka, Y. Ishii, K. Kobayashi K. Role of Rho-kinase in reexpansion pulmonary edema in rabbits. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **289**, L946-53 (2005).
3. M. Kawamura, M. Gika, Y. Izumi, H. Horinouchi, N. Shinya, M. Mukai, K. Kobayashi. The sealing effect of fibrin glue against alveolar air leakage evaluated up to 48 h; comparison between different methods of application. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **28**, 39-42 (2005).
4. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. One-year observation of Wistar rats after infusion of Hb-vesicles (Artificial oxygen carriers). *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* (2006) in press.

(総説、著書など)

1. 小林紘一. 外科医のための輸血医学講座 人工血液の現在と将来. *外科*, **68**, 82-87 (2006)
2. 小林紘一、山崎真敬、饗庭了、四津良平、土田英俊. ハートナーシング, **18**, 965-969 (2005)
3. 堀之内宏久、泉陽太郎、小林紘一、土田英俊. 人工酸素運搬体の開発 現状と将来展望. *検査と技術*, **33**, 879-881(2005)
4. 小林紘一. 外科領域における輸血と血液製剤の現状と展望 人工血液. *日本外科学会雑誌* **106**, 31-37 (2005)
5. 堀之内宏久、藤本博之、小林紘一/ 細径気管支鏡/ Annual Review 呼吸器 2005,152-155(2005)
6. 酒井宏水、宗慶太郎、武岡真司、小林紘一、土田英俊. 人工赤血球. 「医療用マテリアルと機能膜」第 5 章, pp 107-118, (株)シーエムシー出版, 2005. 5.31
7. 土田英俊、酒井宏水、小松晃之、小林紘一、酸素輸液(人工赤血球)の臨床応用、先端医療シリーズ 3 7 「人工臓器・再生医療の最先端」第 16 章-4.

pp. 279-286, 2005 寺田国際事務所 / 先端医療技術研究所

8. 土田英俊、小林絃一、(トピックス)輸血製剤への新しい取り組み：人工赤血球、麻酔科診療プラクティス 18. 周術期の輸液・輸血療法, pp. 270-273, 2005 文光堂

9. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, and E. Tsuchida, "Hemoglobin-Vesicles as a Molecular Assembly: Characteristics of Preparation Process and Performances as Artificial Oxygen Carriers." In "Blood Substitutes" (Ed. By Robert M. Winslow, Elsevier), Chapt. 44, pp. 514-522, 2006.

10. T. Komatsu, Y. Huang, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. "Albumin-heme: a synthetic heme-based oxygen carrier". In "Blood Substitutes" (Ed. By Robert M. Winslow, Elsevier), Chapt. 46, pp. 532-539, 2006.

11. E. Tsuchida, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* (2006), in press.

2. 学会発表

1. 堀之内宏久、羽藤泰、黒田浩章、塚田紀理、藤本博行、山本学、泉陽太郎、江口圭介、渡辺真純、川村雅文、小林絃一、神谷一徳、川久保雅祥 / 胸壁切除に対する再建症例の検討 胸壁再建症例は QOL が低下するか / 第 105 回日本外科学会定期学術集会 / 2005.5.11-13 / 名古屋

2. 酒井宏水、宗慶太郎、武岡真司、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)大量投与後の細網内皮系における代謝過程 / 第 54 回高分子学会年次大会 / 2005.5.25-27 / パシフィコ横浜

3. 酒井宏水、堀之内宏久、武岡真司、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) による血液希釈後の回復過程 / 第 53 回日本輸血学会総会 / 2005. 5.26-28 / 浦安

4. 堀之内宏久、黒田浩章、神谷一徳、羽藤泰、川久保雅祥、塚田紀理、藤本博行、竹内健、泉陽太郎、江口圭介、渡辺真純、川村雅文、小林絃一 / 再発肺癌に対する外科的治療 / 第 22 回日本呼吸器外科学会総会 / 2005.6.2-4 / 京都

5. 堀之内宏久、黒田浩章、神谷一徳、羽藤泰、川久保雅祥、塚田紀理、藤本博行、泉陽太郎、江口圭介、渡辺真純、川村雅文、澤藤誠、小林絃一 / 食道癌気管浸潤に対するステント治療 / 第 28 回日本呼吸器内視鏡学会総会 / 2005.6.9-10 / 東京都新宿区

6. 山本尚志、堀之内宏久、山本学、小林絃一、小松晃之、中川晶人、黄宇彬、弘津一郎、甲斐俊哉、土田英俊 / 麻酔下イヌ出血ショックモデルを用いた人工酸素輸液アルブミン-ヘムの酸素運搬能評価 / 第 12 回日本血液代替物学会年次大会 / 2005.6.6-6.7 / 早稲田大学

7. 山本学、堀之内宏久、渡辺真純、酒井宏水、武岡真司、勢司泰久、佐藤夏枝、須賀裕子、小林絃一、土田英俊 / ビーグル犬 50%脱血ショックモデルにおける HB 小胞体の蘇生効果と安全性評価 / 第 12 回日本血液代替物学会年次大会 / 2005.6.6-6.7 / 早稲田大学

8. 酒井宏水、勢司泰久、堀之内宏久、池田栄二、武岡真司、土田英俊、小林絃一 / ヘモグロビン小胞体の単回投与 1 年後の血液生化学、組織病理学的検討 / 第 12 回日本血液代替物学会年次大会 / 2005.6.6-6.7 / 早稲田大学

9. 泉陽太郎、山本学、竹内健、渡辺真純、堀之内宏久、寺村祐治、酒井宏水、武岡真司、土田英俊、小林絃一/ 人工酸素運搬体へモグロビン小胞体による固形腫瘍の酸素化の試み/ 第 12 回日本血液代替物学会年次大会/ 2005.6.6-6.7/ 早稲田大学
10. 堀之内宏久、山本尚志、小林絃一、小松晃之、土田英俊/ 赤血球代替物の適応 人工酸素運搬体による腫瘍酸素化と放射線治療効果増強について 実験的検討/ 第 12 回日本血液代替物学会年次大会/ 2005.6.6-6.7/ 早稲田大学
11. 酒井宏水、勢司泰久、佐藤夏枝、堀之内宏久、武岡真司、土田英俊、小林絃一/ 赤血球代替物の安全性 へモグロビン小胞体による 50%出血ショック後の回復過程/ 第 12 回日本血液代替物学会年次大会/ 2005.6.6-6.7/ 早稲田大学
12. 小林絃一/ 人工酸素運搬体の製造に関するガイドラインの策定 血液代替物学会の取り組みと役割/ 第 12 回日本血液代替物学会年次大会/ 2005.6.6-6.7/ 早稲田大学
13. K. Kobayashi The Efficacy of Hemoglobin-Vesicle, An Artificial Oxygen Carrier, In Hemorrhagic Shock / ASAIO 51st Annual Conference/ Jun, 2005/ Washington, USA
14. H. Sakai, Y. Seishi, N. Satoh, H. Horinouchi, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Fourteen days observation after resuscitation from hemorrhagic shock using Hb-vesicles suspended in recombinant albumin in a rat model. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
15. H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, K. Sou, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Recovery after 40% exchange transfusion with Hb-vesicles suspended in recombinant albumin: physiological capacities for degradation of Hb-vesicles and hematopoiesis. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
16. H. Sakai, Y. Seishi, K. Ohta, H. Horinouchi, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Histopathological and plasma biochemical analyses one year after bolus infusion of Hb-vesicles in Wistar rats. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
17. M. Yamamoto, K. Kobayashi, H. Horinouchi, H. Yamamoto, H. Sakai, S. Takeoka, Y. Suka, E. Tsuchida. / Safety and effectiveness of hemoglobin vesicles in 50% hemorrhage shock model in dog / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
18. K. Kobayashi, H. Horinouchi, Y. Izumi, M. Watanabe, H. Yamamoto, R. Yozu, H. Sakai, T. Komatsu, Y. Huang, A. Nakagawa, S. Takeoka, and E. Tsuchida. / Preclinical studies of Hb-vesicles and albumin-hemes. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
19. Y. Izumi, M. Yamamoto, K. Takeuchi, M. Watanabe, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Systemic administration of hemoglobin vesicle augments radiation response in lewis lung carcinoma. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
20. H. Yamamoto, H. Horinouchi, M. Yamamoto, K.

Kobayashi, T. Komatsu, A. Nakagawa, Y. Huang, I. Hirotsu, T. Kai, E. Tsuchida. / Exchange transfusion with entirely synthetic red-cell substitute albumin-heme into anesthetized dogs: physiological responses and oxygen delivery / 10th International Symposium on Blood Substitutes / 2005.6.12-15/ Providence, RI/

21. H. Horinouchi, H. Yamamoto, T. Oba, M. Haraguchi, K. Kobayashi, T. Komatsu, E. Tsuchida. / Enhanced radiation response by using artificial oxygen carrier: albumin-heme (rHSA-FecycP). / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/

22. 酒井宏水、武岡真司、小林絃一、土田英俊／人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)／第 34 回医用高分子シンポジウム／2005. 8.1-2.／東京、上智大学

23. 小林絃一/ 日本胸部外科学会の進むべき方向/ 第 58 回日本胸部外科学会定期学術集会/ 2005.10.5-7/ 岡山

24. 堀之内宏久、山本尚志、小林絃一、小松晃之、土田英俊/ 人工酸素運搬体投与による放射線抗腫瘍効果増強についての実験的検討/ 第 43 回日本癌治療学会総会学術集会/ 2005.10.25-27/ 名古屋

25. 堀之内宏久、塚田紀理、神谷一徳、川久保雅祥、黒田浩章、朝倉啓介、池田達彦、泉陽太郎、江口圭介、渡辺真純、川村雅文、小林絃一/ 肺癌気管支形成症例の再発様式についての臨床的検討/ 第 46 回日本肺癌学会総会/ 2005.11.25-26/ 幕張メッセ

26. 酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊／人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の代謝過程における脾臓微小循環の動的解析／第 43 回日本人工臓器学会大会／2005.11.30-12.2／東京

27. 小林絃一、堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊／日本発の人工臓器 基盤技術の創出と開発の現況 人工赤血球製剤(ヘモグロビン小胞体)の臨床試験に向けて／第 43 回日本人工臓器学会大会／2005.11.30-12.2

28. 小林絃一／人工赤血球の臨床応用へ向けて／人工血液をつくる／2006.2.11／日本科学未来館

G. 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： 1. Hb 小胞体が免疫系に及ぼす影響
2. Hb 小胞体のヒト造血前駆細胞へのコロニー形成への影響 (*in vitro* 試験)
3. Hb 小胞体が血液型判定に及ぼす影響

分担研究者	池田 久實	北海道赤十字血液センター	所長
研究協力者	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
	若本志乃舞	北海道赤十字血液センター	研究部
	高橋 大輔	北海道赤十字血液センター	研究部

研究要旨

(1) Hb 小胞体 (HbV) 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。平成 16 年度は、HbV 投与後、一過性に脾細胞の非特異的的刺激 (Con A) に対する応答性が低下すること、応答性の低下には NO が関与している可能性のあることを報告したので、平成 17 年度には HbV 投与の非特異的的刺激 (Con A に対する応答性) に加え、抗原特異的な免疫応答 (KLH に対する免疫応答) に与える影響について検討した。その結果、Con A に対する脾細胞の応答性と同様に、HbV 投与後 KLH に対する二次応答反応の低下も示された。この現象について今後、作用機序の解明が必要である。

(2) HbV の造血機能に与える影響について、ヒト臍帯血を材料とし *in vitro* コロニーアッセイ系を用いて検討した。HbV 存在下で臍帯血中の単核球中から形成されるコロニー数は、コントロールと同等であり異常が無かった。しかし High proliferative potential-colony forming cells (HPP-CFC) は、HbV 濃度に依存してコロニー数が減少した。一方、HbV 存在下で一晩、或は 3 日間培養した後、或はヒトストローマとの共培養系で 2 週間培養後、HbV を除いて培養を継続した場合には HPP-CFC への抑制効果はほぼ解除された。これらはあくまで *in vitro* の閉鎖系での過酷な条件での観察結果であり、*in vivo* では、HbV の影響はより軽度であると考えてよい。

(3) HbV を含んだ全血の血液型を既存の血液型検査法にて判定できるか否かも検討した。試験管法のオモテ試験は判定が容易であった。ウラ試験も HbV により判定が困難な場合には洗浄操作を行えば、凝集の有無を判定することは容易であった。

1. Hb 小胞体が免疫系に及ぼす影響

A. 研究目的

これまで Hb 小胞体(HbV)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殆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。ラット免疫系への影響についての検討では、コンカナバリン A (Con A) 刺激による脾 T 細胞増殖反応は、HbV を投与して 6 時間後では高濃度 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、免疫系への影響として Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) に対する二次免疫応答への影響について検討した。

B. 研究方法

1. ConA 刺激に対する免疫応答への影響の検討

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 HbV (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 saline を輸注した。投与 6 時間、1, 3, 7 日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-mercaptoethanol) 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 \times 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。

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。

2. KLH に対する脾リンパ球の反応性の検討

KLH によるラットの priming:

50mL の生理食塩水あるいは KLH 溶液 (200mgKLH in 50mL saline) を 1ml の 50% Incomplete Freund's adjuvant と混和し、その 0.5ml (100mg KLH) をラットに皮下注射し 5-7 日間を priming の期間とした。その後、KLH を抗原として、ConA に対する脾細胞の反応と同様の実験を行った。

In vitro に於ける抗原刺激として用いる KLH の最終濃度は 0, 1, 3, 10 あるいは 30mg/ml とした。HbV 投与 6 時間後の脾細胞のリンパ球サブセットは FCM で検討した(Fig. 1)。

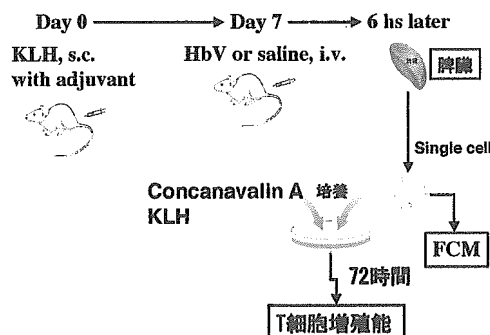


Fig. 1 Experimental protocol