

## C. 実験結果

### 1. ConA 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、HbV 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、HbV 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

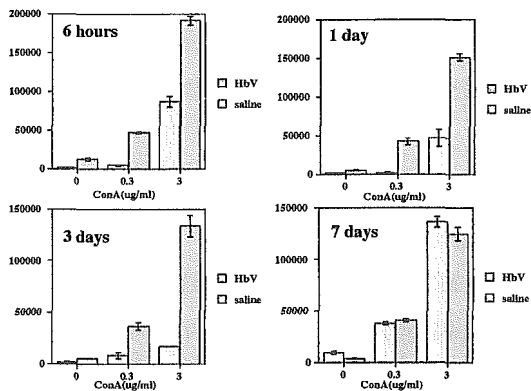


Fig. 2 Inhibition of ConA stimulated proliferation of splenocytes following injection of HbV or saline. N=3, mean $\pm$  SEM

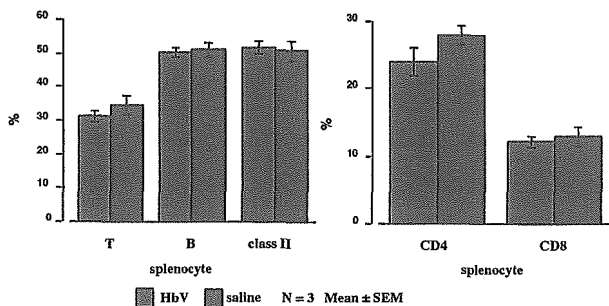


Fig. 3 Analysis of KLH sensitized rats following injection of HbV or saline on day 7 via i.v. by FCM.

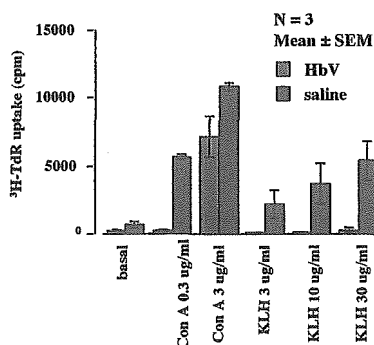


Fig. 4 The effect of HbV injection on secondary response of splenocytes to KLH

投与群と同等の反応性を示したことを報告した。平成 17 年度に、Con A 刺激に対する応答性の回復過程をさらに検討してゆく中で、HbV 投与による反応性の抑制効果は、短くとも投与後 3 日までは続くこと、投与 7 日目には完全に回復することが判明した。また、この抑制は低濃度(0.3mg/ml)の Con A だけではなく、高濃度(3mg/ml)の Con A においても、実験毎に程度は異なるが認められることが明らかになった。(Fig. 2)

### 2. KLH に対する secondary response の応答性

HbV 投与後 6 時間後の脾細胞のサブセットは saline 投与群と同様であった (Fig. 3)。Con A に対する応答性と同じように、KLH に対する二次応答性も HbV 投与後 6 時間の脾細胞では明らかに低下していた。この傾向は調べた限りでは全て濃度の KLH に対しても認められた(Fig. 4)。

## D. 考察

今回の検討から、HbV の投与により、蛋白抗原に対する二次免疫応答が少なくとも投与後 6 時間では抑制されることが判明した。現時点では、Con A 刺激と同じように HbV 投与後 7 日目では、抑制が解除される結果を得ているが、確認実験が必要である。この現象は HbV が脾臓へ大量に集積することが原因と考えられる。外来抗原 (例えばウイルス) に対する反応は局所のリンパ節における免疫応答が重要と考えられるので、局所リンパ節の免疫担当細胞群においても同様なことが認められるかどうかも検討が必要と思われる。ヒトにおいても同様な現象が見られるかどうかは、不明であるが、たとえ、ヒトでこの現象が認められたとしても、ラットの場合少なくとも ConA に対する反応性は HbV 投与後 7 日以内には回復しているので、ヒトにおいても、長期に持続するものではないと考えられる。今後、一過性の抑制がどのような機序で起こるのかを解明することは、HbV の大量投与が生体に及ぼす影響を明らかにする上で重要で

あると思われる。

## E. 結論

HbV の投与により、非特異的マイトージェンである ConA に対する反応と同様に蛋白抗原(KLH)に対する脾細胞の二次免疫応答反応が抑制される。この現象は脾の免疫応答に限局してみられるものである可能性もありその詳細について今後の検討が必要である。

## 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)

### A. 研究目的

Hb 小胞体(HbV)をラットに投与しても末梢血の血球数には重大な異常は認めないという報告はある。しかし、ヒトへの投与を考えた時、その造血前駆細胞の分化、増殖への影響について *in vitro* の系で検討しておく必要があると思われる。そこで今回は主として、HbV のヒト造血前駆細胞のコロニー形成能への影響について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. コロニーアッセイ

ヒト臍帯血より Ficoll-Paque を用いて、単核球分画を分離し、その中の CD34 陽性(CD34+)細胞の割合から 1 well あたり CD34+細胞が 300 個含まれるように設定し、35mm dish (Nippon Becton Dickinson Co [BD], Tokyo, Japan)に撒いた。Medium としてヒト細胞用コロニー測定用完全メチルセルロース培地 (Methocult GFH4434V) を用いた。Medium 中に HbV 溶液 (以下 HbV) を(0, 0.09, 0.187, 0.375, 0.75, 1.5, 3%)になるように加え、2 週間培養後に、Burst forming unit of erythrocyte(BFU-E)、Colony forming unit of granulocyte and macrophage

(CFU-GM)、CFU-MIX、Colony forming cells (CFC) をカウントした。High proliferative potential-CFC(HPP-CFC)は、培養開始 4 週後にカウントした。幾つかの実験では、30%FCS、1%BSA、SCF、G-CSF、GM-CSF、IL-3、Epo を含んだ IMDM に CD34+細胞として 1500 個/ml となるように CBMNCs を浮遊させ、HbV(0, 0.375, 3%)を加え、一晚或いは 3 日間インキュベートした。その後、細胞を回収し、洗浄で HbV を除去したのち、得られた細胞全体を 5ml の MethoCult GF に浮遊させた。35mm dish にその 1ml(CD34+細胞として 300 個相当)を加え 2 週間培養後にコロニーアッセイを行った。

#### 2. 液体培養

ヒト単核球分画から CD34+細胞を純化し、5000 個の CD34+細胞を 4ml の medium に浮遊し、12.5 cm<sup>2</sup> Flask (Nippon Becton Dickinson Co [BD], Tokyo, Japan)にて 7 および 10 日間培養したのち、総細胞数をカウントした。顆粒球系の培地は IMDM(Gibco BRL, Rockville, MD)に 30% fetal bovine serum (FBS; Equitech Bio., Inc, Igram, TX)、1% bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical)、10ng/ml human IL-3、10ng/ml human SCF (provided by Kirin Brewery)、10ng/ml G-CSF (a gift from Chugai Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)、50U/mL GM-CSF(4.5X10<sup>7</sup>U/mg; Schering Research, Bloomfield, NJ, USA)を添加した。赤芽球系の培地は IMDM(Gibco BRL, Rockville, MD)に 30% fetal bovine serum (FBS; Equitech Bio., Inc., Igram, TX)、1% bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical)、10ng/ml human IL-3、10ng/ml human SCF (provided by Kirin Brewery)、2U/ml human erythropoietin (Epo: provided by Chugai Pharmaceutical Co.)を添加した。

#### 3. 骨髄ストローマ細胞との共培養

骨髄ストローマ細胞としてヒトテロメラゼ遺伝子を導入して不死化したヒトストローマ細胞株

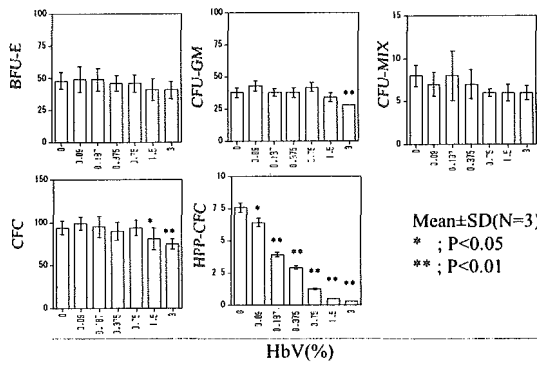


Fig. 1 Effect of HbV on colony formation of MNCs derived from cord blood

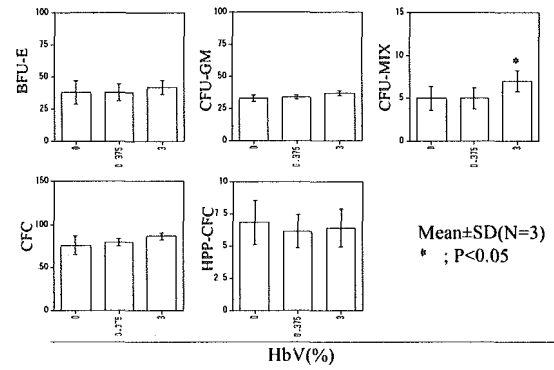


Fig. 2 Effect of HbV on colony formation of MNCs derived from cord blood. MNCs were incubated in liquid medium overnight in the presence or absence of HbV, then colony assay was performed.

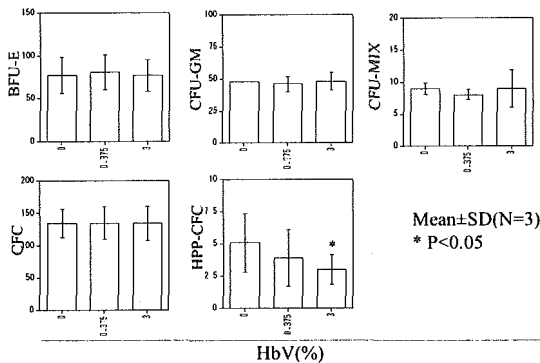


Fig. 3 Effect of HbV on colony formation of MNCs derived from cord blood. MNCs were incubated in liquid medium for 3 days in the presence or absence of HbV, then colony assay was performed.

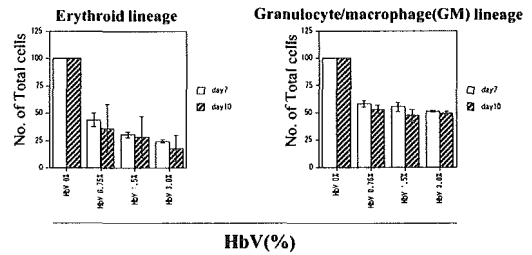


Fig. 4 Effect of HbV on cell proliferation of purified CD34+ cell derived from cord blood. Purified CD34+ cells were cultured in the liquid medium for 7 or 10 days in the presence or absence of HbV. Then, total cell number was counted. For the culture of erythroid and GM lineage cell, IL3+SCF+Epo, IL3+SCF+G-CSF+GM-CSF was added in the medium, respectively.

を用いた。12.5cm<sup>2</sup> Flask にストローマ細胞を培養し、コンフルエント状態にして放射線照射後、純化 CD34+細胞を medium 4ml に浮遊させ HbV(0, 0.75, 1.53%)を加えて共培養(5000 個/4ml/Flask)を行った。Medium(X-vivo10)(BioWhittaker, Walkersville MD) に human TPO (50 ng/ml、 a gift from Kirin Brewery Co Ltd, Tokyo, Japan)、 human SCF (10ng/ml, provided by Kirin Brewery) and human FL (100ng/ml, a gift from Immunex Corporation, Seattle, WA)を添加したものを使用した。培養開始 1 週間目に、medium 4ml を添加した。培養 2 週後に細胞を回収後、洗浄し、CD34+細胞の割合をフローサイトメーターで確認し CD34+細胞として約 300 個/dish となるように調整してコロニーアッセイを行った。

## C. 実験結果

### 1. HbV の臍帯血単核球のコロニー形成能に与える影響

臍帯血単核球を HbV と混合して培養した場合には培養 2 週間後に行う通常のコロニーアッセイ

(BFU-E、CFU-GM、CFU-MIX そして CFC)ではコロニー形成能への明らかな影響は認めなかった。しかし、培養後 4 週間後に行う HPP-CFC の形成能で評価すると、HbV の濃度依存的にコロニー形成への抑制効果が認められた(Fig. 1)。

しかしながら、HbV との共培養時間を一晩あるいは 3 日間にし、その後洗浄操作にて HbV を除去した後に改めてコロニーアッセイをおこなってみると、一晩の共培養では HPP-CFC の抑制はなかったが 3 日間の場合には濃度依存性を持って HPP-CFC のコロニー形成能が抑制された (Fig. 2, 3)。

### 2. 液体培養系での細胞増幅への影響

コロニー形成能の検討では得られた細胞の総数が不明なため、液体培養系を用いて、CD34+細胞の増幅へ与える HbV の影響を検討した(Fig. 4)。赤芽球を増幅する培養条件および顆粒球マクロファージを増幅する培養条件下では、いずれも HbV の濃度依存的に得られる総細胞数が減少していた。

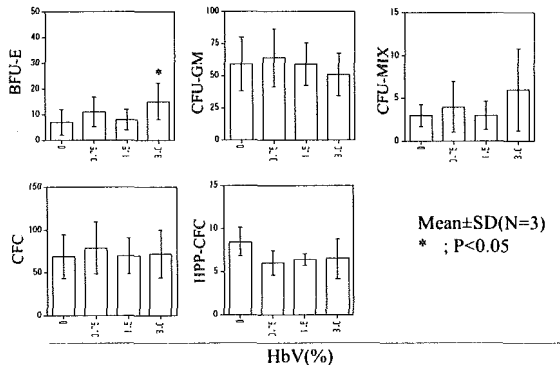


Fig. 5 Effect of HbV on colony formation of CD34+ cells derived from cord blood. CD34+ cells were cocultured with stroma cell in liquid medium for 2 weeks in the presence or absence of HbV, before colony assay was performed.

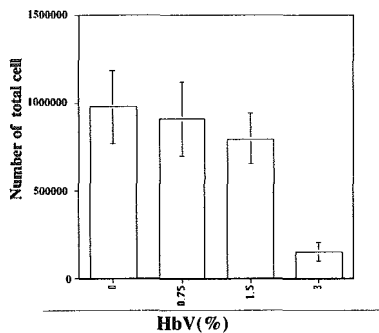


Fig. 6 Effect of HbV on cell proliferation of purified CD34+ cell derived from cord blood. Purified CD34+ cells were cocultured with stroma cell in liquid medium for 14 days in the presence or absence of HbV. Then, total cell number was counted.

### 3. ストローマ細胞との共培養下でのHbVのコロニー形成能への影響

生体内での条件により近づけるために、純化したCD34+細胞をストローマ細胞と共培養した条件のもとで、HbVを2週間作用させ、その後細胞を回収、洗浄によりHbVを除去したのちコロニーアッセイを施行した。その結果、いずれのコロニー形成についてもHbVによる抑制効果は認めなかった(Fig. 5)。しかしながら、培養2週間までに増幅してくる総細胞数は、CD34+細胞単独の液体培養の結果と同様に濃度依存性を持って抑制されていた(Fig. 6)。

#### D. 考察

本検討の目的は、HbV自体のヒト造血幹細胞に対する*in vitro*での影響(毒性)を検討することである。臍帯血から分離した単核球分画にHbV溶液

を混和してコロニーアッセイを行った結果から、HbVは、通常のコロニー形成能には影響を与えないことが示された。しかし、コロニー形成能を持つ造血前駆細胞の極一部のものは、増殖能が高く、培養4週間では1mm以上の大きさのコロニーを形成しHPP-CFCと呼ばれる。このHPP-CFCの形成ではHbVの濃度依存的に抑制が認められた。この場合、通常のコロニー形成能(培養2週目でのコロニーアッセイ)がほとんど抑制を受けてないことから、HPP-CFCにまで至ることのできる未熟な細胞はHbV存在下でも生存していてコロニーを形成することはできるが、さらに2週間の延長培養で増幅を続けてHPP-CFCと認識されるまでの大きさにまでは至らないと思われる。言い換えると、HbV溶液は細胞の増殖(特にHPP-CFCを形成するポテンシャルをもつ細胞)を抑制するが、細胞の破壊的な障害は引き起こさないとと思われる。

生体内では投与されたHbVは、速やかに代謝され体内から消失することが報告されていることから、HbVと一晩或いは3日間インキュベーションした後にHbVを除去してコロニー形成能を調べたが、最も高い濃度でHPP-CFCの僅かな抑制を認めたのみであった。この結果も上記の推測を指示する。

また、生体内では、造血幹細胞は常に骨髓ストローマを主体とする支持組織とともに存在することから、ストローマとの共培養系でのHbV溶液の影響を検討することはその*in vivo*での作用を想像する上で重要と考えられる。注目すべき事にストローマとの共培養系の場合には、2週間HbVと共培養したあとに回収した細胞集団のHPP-CFCの形成能には影響を認めなかった。恐らくストローマの産生する何らかの液性因子、あるいはストローマと造血幹細胞との直接のinteractionによりHPP-CFC形成のpotentialが保たれたためと考えられる。以上のことから、HbVが例え長期に骨髓環境で留まっていたとしても、造血前駆細胞のコロニー形成能に大きな影響をもたらさないと推定で

きる。

我々の得た実験結果からは、実験条件をより生体に近づけるとコロニー形成能には、影響はないと考えられるが、液体培養系で細胞の増殖という観点でみると実験系に加えた HbV の濃度依存的に抑制されるという結果であった。これは、ストローマの有無に関わらず同様の傾向を示した。しかしストローマとの共培養の系では、増幅して得られた細胞集団のコロニー形成能はコントロールと同等であったことから、細胞障害作用は無いものと考えられる。増殖が抑制される原因は不明であるが、一部の増殖因子が HbV を構成している脂質膜にトラップされる可能性がある。

得られた結果はあくまでも HbV が含まれる *in vitro* 閉鎖系の結果であり、生体内環境とは異なると思われるので、この結果をもって *in vivo* での造血前駆細胞の増幅への効果を類推することは適当ではないと思われる。実際、マウスやラットへの HbV 投与で、貧血や汎血球減少は観察されていない。

## E. 結論

HbV の存在下では確かに HPP-CFC の形成には抑制的に作用するが、HPP-CFC は全体のコロニーのごく一部であること、実際の生体内での HbV の動態を想定した実験条件では HPP-CFC のコロニー形成の抑制の解除が見られることなどから、HbV が生体に投与されても造血前駆細胞のコロニー形成能に与える影響は少ないと思われる。

## 3. Hb 小胞体が血液型判定に及ぼす影響

### A. 研究目的

緊急時には、患者の血液型を調べる前に、Hb 小胞体 (HbV) を投与しなければならない局面が考えられる。その後、改めて、患者から採血し血液

型を判定する場合に、既に投与した HbV が血液型判定 (ABO 血液型、Rh 血液型) に影響を及ぼすことが危惧される。そこで、血液中に混入する HbV が血液型判定の障害になるか否かを検討することを目的とした。

### B. 実験方法

血液型既知 (A, B, O, AB 型および O 型, Rh+, Rh-) の抗凝固剤加血液に、HbV を 40%、20%、10% 添加し被検検体とした。また対照として未添加検体を用いた。HbV を添加した被検検体と対照検体を 3,000rpm、5min 遠心し上清 (血漿) をウラ試験 (被検者の血漿あるいは血清中の凝集素の有無を調べる検査) に、血球沈査を生理食塩液で 3~5% の血球浮遊液としオモテ試験 (被検血球表面の血液型物質を抗 A あるいは抗 B-抗体にて検出する試験) に使用した。検査法は ABO 血液型オモテ試験に試験管法およびガラス板法を、ウラ試験に試験管法を、Rh 血液型には試験管法を日臨技輸血検査標準法の血液型検査法に準じて行った。検査用試薬としてマウス由来モノクローナル抗 A、抗 B (バイオクロン、オーソ)、A 型血球、B 型血球 (北海道赤十字血液センター製)、ヒト由来モノクローナル抗 D (日本赤十字社製) を用いた。各検査法について被検検体と対照検体の凝集像および判定結果を比較した。

### C. 実験結果

ABO 血液型オモテ試験では試験管法ガラス板法ともに A, B, O, AB 型いずれの血液型も凝集像、非凝集像に違いは見られず判定可能であった (Fig. 1-4, Upper)。Rh 血液型についても凝集像、非凝集像に違いはみられず判定可能であった (Fig. 5)。オモテ試験をガラス板法で行った場合も、血液型の判定は容易であった (Fig. 6)。これらの結果を表にまとめた (Table 1)。また、ABO 血液型ウラ試験においては、HbV を高濃度に添加した場合、HbV の色素により凝集の確認が困難であった。

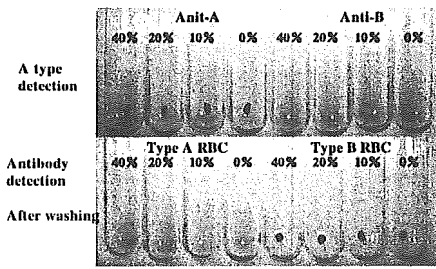


Fig. 1 Detection of type A red blood cells by standard manual test tube method. Type A blood was mixed with HbV(0%-40%) then blood type was determined by anti-A and B monoclonal antibody (Upper). Only anti-B antibody(hemagglutinin) was detected in the plasma(Lower).

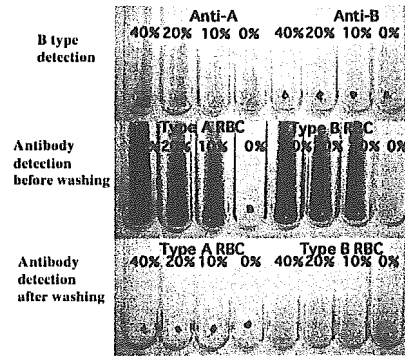


Fig. 2 Detection of type B red blood cells by standard manual test tube method. Type B blood was mixed with HbV(0%-40%) then blood type was determined by anti-A and B monoclonal antibody(Upper). Only anti-A antibody(hemagglutinin) was detected in the plasma(Middle and Lower).

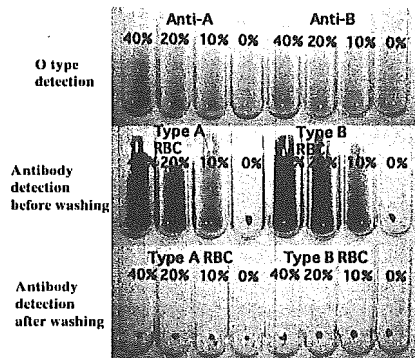


Fig. 3 Detection of type O red blood cells by standard manual test tube method. Type O blood was mixed with HbV(0%-40%) then blood type was determined by anti-A and B monoclonal antibody (Upper). Both anti-A and B antibody(hemagglutinin) was detected in the plasma(Middle and Lower).

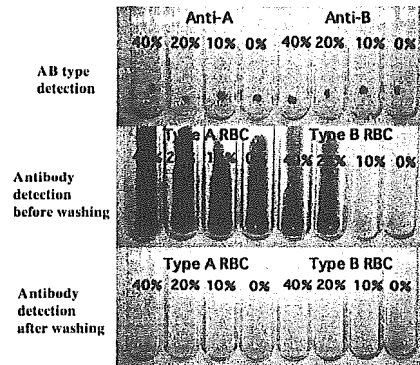


Fig. 4 Detection of type AB red blood cells by standard manual test tube method. Type AB blood was mixed with HbV(0%-40%) then blood type was determined by anti-A and B monoclonal antibody(Upper). Neither anti-A or B antibody(hemagglutinin) was detected in the plasma(Middle and Lower).

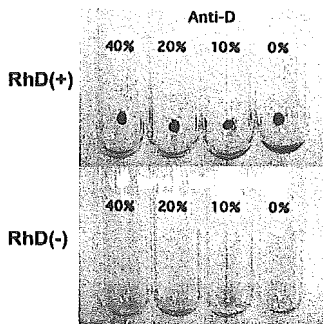


Fig. 5 Rh D(+) or RhD(-) blood was mixed with HbV(0%-40%) then Rh type was determined by anti-D monoclonal antibody.

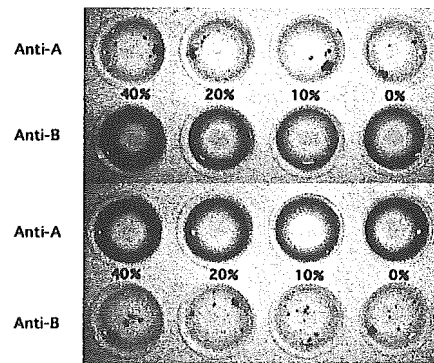


Fig. 6 Type A(Upper) or type B(Lower) blood was mixed with HbV(0-40%) then blood type was determined using standard manual glass plate method.

Table 1 Summary of test results

|         | Hemoglobin vesicle (HbV)(%) |    |    |    |     |       |    |    |     |    |       |    |    |    |    |
|---------|-----------------------------|----|----|----|-----|-------|----|----|-----|----|-------|----|----|----|----|
|         | 40%                         |    |    |    | 20% |       |    |    | 10% |    |       |    | 0% |    |    |
| Type A  | 抗A                          | 4+ | 4+ | 4+ | 4+  | A RBC | -  | -  | -   | -  | B RBC | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Type B  | 抗A                          | -  | -  | -  | -   | A RBC | 4+ | 4+ | 4+  | 4+ | B RBC | -  | -  | -  | -  |
| Type O  | 抗A                          | -  | -  | -  | -   | A RBC | 4+ | 4+ | 4+  | 4+ | B RBC | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Type AB | 抗A                          | 4+ | 4+ | 4+ | 4+  | A RBC | -  | -  | -   | -  | B RBC | -  | -  | -  | -  |
| Rh+     | 抗D                          | 4+ | 4+ | 4+ | 4+  |       |    |    |     |    |       |    |    |    |    |
| Rh-     | 抗D                          | -  | -  | -  | -   |       |    |    |     |    |       |    |    |    |    |

Left half: blood type determination, right half: antibody(hemagglutinin) detection

しかし、間接抗グロブリン試験のように感作血球の洗浄を行うことで凝集像の確認が可能であった (Fig. 1-4, Middle and Low)。

#### D. 考察

標準法による血液型検査では、ウラ試験において残存する HbV により、凝集像の確認が困難となる場合があるが、置換操作(血球の洗浄操作)のみで判定可能となることから、血液型判定に与える影響は極めて低いと考えられる。また、オモテ試験では血球を洗浄したあと遠心して血球沈査を使うが、その際に HbV を含む血清部分をしっかり取り除かないと、ガラス板法において凝集像が Mix field 様になってしまうため注意が必要と考えられる。そのことに注意すれば、写真のごとく 40%の HbV 存在下の血液であっても、明瞭な血球の凝集像が観察された。今回の試験では実施していないが遠心分離した血清(血漿)をさらに遠心 (15,000rpm, 45min) し、HbV と血清(血漿)成分を分離することでも、ABO 血液型ウラ試験での HbV の影響を回避できるのではないかと考える。

#### E. 結論

全血中に HbV が存在していても、血液型判定のオモテ試験の判定の障害にはならない。またウラ試験についても、血球の洗浄操作を加えることで容易に判定できる。

#### F. 健康危険情報

該当無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.* **33**, 101-111 (2005).

2. H. Abe, M. Fujihara, K. Ikebuchi, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Harashima, H. Azuma, H. Ikeda. Interaction of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, with human plasma: Effects on coagulation, kallikrein-kinin, and complement. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **34**, 1-10 (2006)

##### 2. 学会発表

1. 東 寛、池田久實／ヘモグロビン小胞体が免疫系に及ぼす影響について／第 12 回日本血液代替物学会総会／2005.6.6-7／東京
2. 阿部英樹／人工酸素運搬体とウイルス・プロセスバリデーション／第 12 回日本血液代替物学会総会／2005.6.6-7／東京
3. 阿部英樹, 他／ヘモグロビン小胞体(HbV)がラット免疫系(脾臓細胞)に及ぼす影響／第 12 回日本血液代替物学会総会／2005.6.6-7／東京
4. 藤原満博, 他／In vitro におけるヘモグロビン小胞体の血小板活性化に対する影響／第 12 回日本血液代替物学会総会／2005.6.6-7／東京

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

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：人工赤血球・Hb小胞体の体内動態特性の解析

分担研究者 小田切 優樹 熊本大学大学院医学薬学研究部 教授  
研究協力者 安楽 誠 熊本大学大学院医学薬学研究部 研究員

研究要旨

Hb小胞体（HbV）の構成成分のうち、Hb及び膜構成コレステロールをそれぞれ<sup>125</sup>I及び<sup>3</sup>Hで標識したHbVを用い、HbVの体内動態特性、および細胞への取り込み過程を評価した。HbVの主要な分布・代謝臓器である肝臓及び脾臓での取り込みは、クッパー細胞、脾臓マクロファージが関与していた。またHbVの代謝過程について、<sup>125</sup>I-HbVを用いた検討よりHbは5日以内に尿中へ排泄されること、<sup>3</sup>H-HbVを用いた検討から脂質成分は投与後14日以内に胆汁中から糞中へ排泄されることが明らかになった。

A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)は、ヒト赤血球由来のHbをリン脂質二分子膜中に内包させた、直径約250nmの人工赤血球である。加えて、HbVは優れた物理化学的特性、長期安定性に加え、動物試験においても十分な酸素運搬能を示すことが明らかとなり、輸血に代わり得る酸素輸液としての実用化が期待されている。その安全性に関しては、血液生化学的パラメータの測定及び循環動態、免疫等の機能維持に関する検討が行なわれてきた。HbVの体内動態に関して、<sup>99m</sup>Tc 標識した hexamethylpropylenamine oxime (HMPAO) をHbV内部に共封入し、ラットに投与後の血漿中推移及び臓器分布をモニターした報告があるものの、HbVの構成成分の動態までは観測されていなかった。そこで本研究では、HbVの分布、代謝及び排泄経路を明らかにするため、HbV内部のHbを<sup>125</sup>I標識した<sup>125</sup>I-HbVならびに脂質膜を構成するコレステロールを<sup>3</sup>H標識した<sup>3</sup>H-HbVを用い、マウスにおける体内動態実験を行った。また、この結果を基に、

HbV代謝に関わる細胞群の探索を行った。

B. 研究方法

1. 動物

実験動物はddY系雄性マウス(7週齢, 28~30g)に水と固形飼料を自由に摂取させ、1週間予備飼育の後、実験に使用した。1群3匹とした。

(倫理面への配慮) 動物実験は、科学研究の一般原則に従い、動物の生命を尊重するという基本的観点に基づく動物福祉を護持するための配慮を念頭に置き、熊本大学実験動物倫理委員会のもとに、実験を施行した。

2. <sup>125</sup>I-HbV及び<sup>3</sup>H-HbV投与液の調製

HbVに含有するHb、及びHb溶液の<sup>125</sup>Iラベル化は IODO-GEN Iodination Reagent (Pierce) を用いて行った。また、<sup>3</sup>Hラベル化はHbVとCholesterol,[1,2-<sup>3</sup>H(N)]を混合し、標識後、0.45 nmの滅菌済フィルター(Dismic-25cs, Advantec)で処理後、投与液とした。



### 3. $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVの投与及び採血、放射活性の測定・分析

雄性マウスに非絶食、エーテル麻酔下、 $^{125}\text{I}$ -HbVを $10 \times 10^5$  cpm/匹の用量でマウス尾静脈より投与した。投与後、経時的に開腹し下大静脈より採血した。40%トリクロロ酢酸を加え、血液に含まれるタンパク質を沈殿させ、沈殿中の放射活性をオートウェルガンマカウンター（アロカ製, ARC-2000）にて測定した。採血終了後、下大静脈を切断し放血致死させ、組織を摘出した後、重量を秤量し、各組織の放射活性をオートウェルガンマカウンターにて測定し、MULTIにより半減期及び各臓器クリアランスを算出した。 $^3\text{H}$ -HbVの場合、 $3 \times 10^5$  dpm/30g（タンパク質として1400mg/kg）の用量で尾静脈内投与した。下大静脈から経時的に採血を行い、得られた血漿を19,000rpmで30分間超遠心分離し、血漿に含まれるHbVを沈殿させた。さらに、Ultrafree-CL遠心式フィルターユニット（10,000 NMWL, Millipore）を用いて $^3\text{H}$ -コレステロールを回収後、液体シンチレーションカクテルを加え、放射活性を測定した（LSC-5121, アロカ）。摘出した臓器は、その一部を可溶化後、血液と同様の処理により放射活性を測定した。

### 4. 細胞による $^{125}\text{I}$ -HbV取り込み・分解実験

RAW264.7細胞を細胞培養用プレートに播いて付着させ（ $5 \times 10^5$  cells/well）、HbVの取り込み、分解実験を常法により行った。

## C. 研究結果

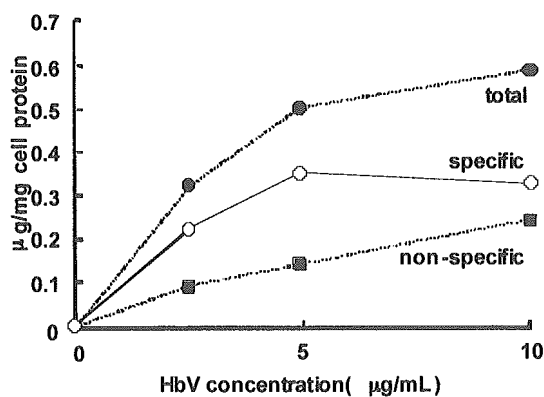
### 1. HbVの細胞取り込み・分解

これまでの報告から、HbVは主に肝臓、脾臓への移行が確認されている。また、肝臓、脾臓への濃度依存的な取り込み抑制も観察されていることから、肝臓、脾臓の取り込み過程において、受容体等を介した担体輸送が関与している可能性が示唆されている。一般に、リン脂質小胞体(リポソーム)製剤は肝臓、脾臓等の食食性マクロファージにより捕捉され、分解されることが知られていることから、臓器取り込みへのマクロファージの関与について細胞を用いて検討した。 $^{125}\text{I}$ -HbVはマウス単球由来マクロファージであるRAW 264.7細胞による特異的な取り込み、分解を受けたことより、 $^{125}\text{I}$ -HbVの肝臓及び脾臓への高い分布には、クッパー細胞及び脾臓マクロファージが関与することが示唆された（Fig. 1）。

### 2. HbV構成脂質の体内動態解析

次に、HbVの脂質膜構成成分であるコレステロールを $^3\text{H}$ 標識した $^3\text{H}$ -HbVを調製し、その体内動態について内包されたHbを $^{125}\text{I}$ 標識した $^{125}\text{I}$ -HbVの結果と比較検討した。その結果、 $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVはほ

#### A. uptake



#### B. degradation

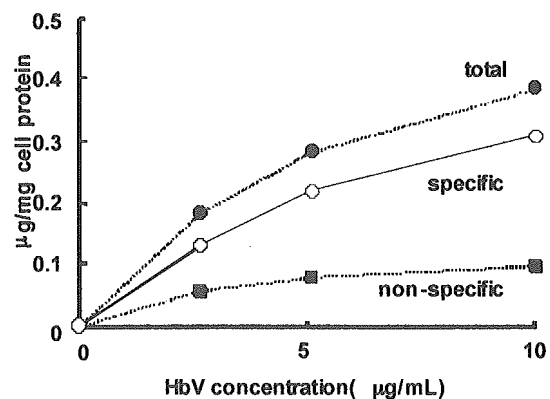
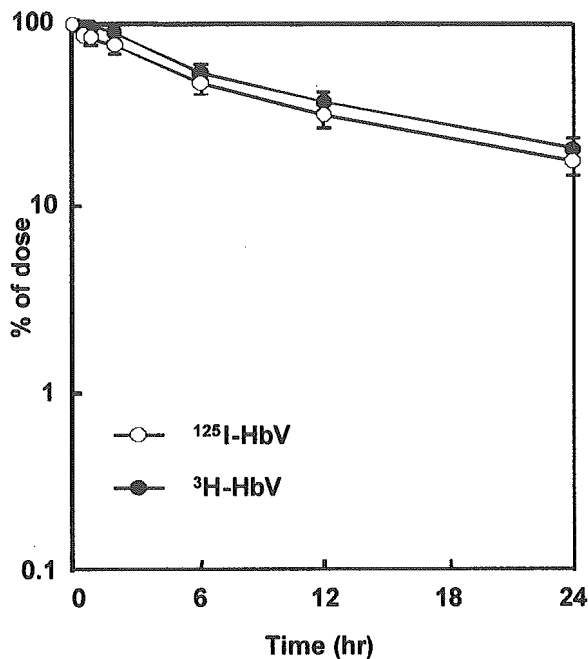


Fig. 1. Dose-dependent endocytic uptake (A) and degradation (B) by RAW 264.7 cells of  $^{125}\text{I}$ -HbV. RAW cells were incubated for 6hr with the indicated concentration of  $^{125}\text{I}$ -HbV in the presence (●) or absence (■) of 50-fold unlabeled ligands. Opened circle (○) indicates specific uptake or degradation of HbV.



**Fig.2.** Relative plasma concentration of  $^{125}\text{I}$ -HbV and  $^3\text{H}$ -HbV after i.v. administration to mice.  $^{125}\text{I}$ -HbV (○) or  $^3\text{H}$ -HbV (●) were injected at a dose of 1400mg/kg. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6)

ば同様の血漿中濃度推移を示し、得られた各パラメータが血漿中におけるHbVの動態に由来するものであることが確かめられた (Fig. 2, Table 1). 次に、肝臓、脾臓による取り込みクリアランス

**Table 1.** Pharmacokinetic parameters of  $^{125}\text{I}$ -HbV and  $^3\text{H}$ -HbV after i.v. administration to mice.

|                               | $^{125}\text{I}$ -HbV | $^3\text{H}$ -HbV |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------|
| $t_{1/2}$ (hr)                | 18.8 $\pm$ 1.3        | 19.9 $\pm$ 0.9    |
| AUC (hr $\cdot$ % of dose/mL) | 829 $\pm$ 28          | 899 $\pm$ 44      |
| CL (mL/hr)                    | 0.12 $\pm$ 0.04       | 0.11 $\pm$ 0.03   |
| $V_{ss}$ (mL)                 | 2.7 $\pm$ 0.6         | 3.2 $\pm$ 1.2     |

Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6).

を算出したところ、 $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVでよく一致し、HbVは小胞体構造を保持した形で臓器へ取り込まれることが示唆された (Table 2)。しかしながら、分布の経時的推移は数時間経過後から明らかに異なり、 $^3\text{H}$ -HbVでは長時間放射活性が維持されることが観察された (Fig. 3)。脾臓においても同様の結果が得られた。このことより、HbVは肝臓及び脾臓において脂質成分とHbが、それぞれ別の代謝、排泄経路を経ることが示唆された。さらに $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbV

**Table 2.** Uptake clearance of  $^{125}\text{I}$ -HbV and  $^3\text{H}$ -HbV after i.v. administration to mice

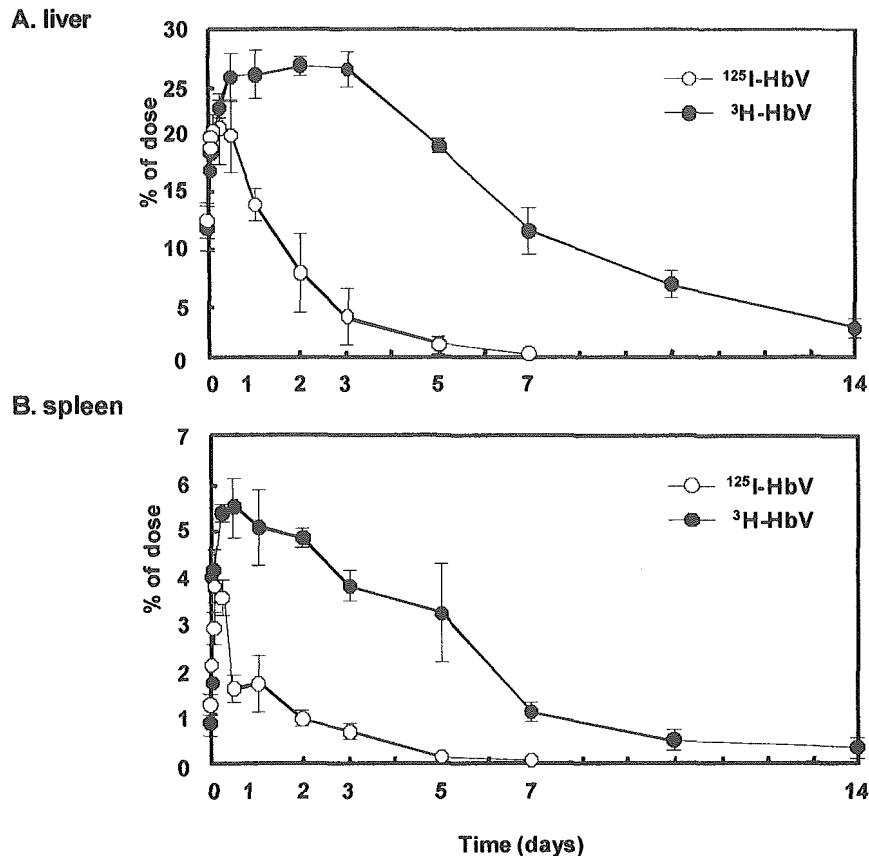
|        | CL <sub>uptake</sub> ( $\mu\text{L/hr}$ ) |                   |
|--------|---|-------------------|
|        | $^{125}\text{I}$ -HbV                     | $^3\text{H}$ -HbV |
| liver  | 256 $\pm$ 37                              | 301 $\pm$ 41      |
| spleen | 51 $\pm$ 6.1                              | 43 $\pm$ 12       |

Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6).

**Table 3.** Urinary and fecal excretion ratio of  $^{125}\text{I}$ -HbV or  $^3\text{H}$ -HbV after i.v. administration to mice,

|                       | % of dose                   |                             |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                       | urine                       | feces                       |
| $^{125}\text{I}$ -HbV | 84.2 $\pm$ 4.1              | 5.1 $\pm$ 2.3               |
| $^3\text{H}$ -HbV     | 19.8 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup> | 71.1 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup> |

Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3). a; p<0.01 vs.  $^{125}\text{I}$ -HbV.



**Fig. 3.** Time dependent distribution of  $^{125}\text{I-HbV}$  and  $^3\text{H-HbV}$  to liver (A) and spleen (B) after i.v. administration to mice.  $^{125}\text{I-HbV}$  (○) or  $^3\text{H-HbV}$  (●) were injected at a dose of 1400mg/kg. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6).

の排泄について検討した結果、 $^{125}\text{I-HbV}$ は投与後7日までに84%が尿中へと排泄され、糞中への排泄は数%であった (Fig. 4, Table 3)。これに対して $^3\text{H-HbV}$ は70%以上が糞中に排泄されていた。データには示していないが、胆汁中にも放射活性が認められ、脂質成分は分解後、胆汁中へ排泄されることが示唆された。

#### D. 考察

本研究は、酸素運搬機能と安全性に優れた人工赤血球製剤の開発を目的としてHbVのマウスにおける体内動態特性を評価した。これまでの報告から、HbVは、主に肝臓、脾臓への移行が確認されている。そこで、HbVの取り込みに関与する細胞の探索を行ったところ、RAW 264.7細胞において $^{125}\text{I-HbV}$ の特異的な取り込み及び分解が認めら

れた (Fig. 1)。一般に、リン脂質小胞体制剤は肝臓、脾臓などの細網内皮系組織 (Reticuloendothelial system; RES) に存在する食細胞によって取り込まれることが知られている。このRESによる取り込みには、補体系活性化によるリポソームのオプソニン化が関与すると考えられているが、今回補体系を不活化させた培養液中においても、RAW 264.7細胞によるHbVの特異的な取り込みが認められたことから、HbVが直接認識されて、肝臓、脾臓へ取り込まれる可能性が示唆された。

次に、HbVの脂質膜構成成分であるコレステロールを $^3\text{H}$ 標識して脂質としての動態について検討した。 $^3\text{H-HbV}$ の肝臓、脾臓への取り込みクリアランスは、 $^{125}\text{I-HbV}$ のものとよく一致したことから、臓器への取り込みは小胞体として行われることが確認された (Table 2)。しかしながら、投与後数時間から両者

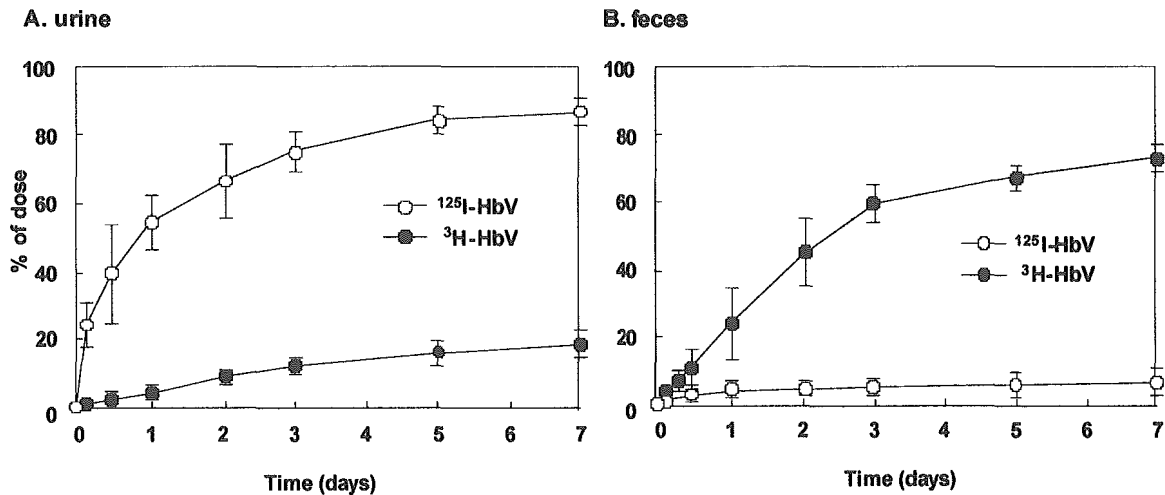


Fig. 4. Time dependent urinary (A) and fecal (B) excretion of  $^{125}\text{I-HbV}$  or  $^3\text{H-HbV}$  after i.v. administration to mice.  $^{125}\text{I-HbV}$  (○) or  $^3\text{H-HbV}$  (●) were injected at a dose of 1400mg/kg. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6).

は異なる推移を示し、 $^{125}\text{I-HbV}$ 投与では5日以内に放射活性が臓器中から消失したが、 $^3\text{H-HbV}$ 投与においては14日後まで活性が認められた (Fig.3)。さらに排泄経路も $^{125}\text{I-HbV}$ と異なり、 $^3\text{H-HbV}$ では70%以上が糞中に排泄された (Fig. 4, Table 3)。このような結果から、小胞体として肝臓、脾臓の貪食細胞に取り込まれたHbVは、Hb及び脂質成分に分かれた後、Hbは5日以内に分解、消失するのに対し、脂質成分であるコレステロールは、臓器内に脂肪滴あるいは細胞膜の構成成分として存在する可能性が示唆された。さらに排泄経路に関しては、脂肪滴あるいは膜構成脂質として存在するコレステロールを、高密度リポ蛋白(HDL: high density lipoprotein)等の血清リポタンパク質が内部へ取り込み、肝臓の実質細胞へ運搬することで、胆汁中に遊離コレステロールあるいは胆汁酸として排泄されるという経路が示唆された。事実、血漿を19000rpmで30分間超遠心分離し、HbVを沈殿除去した残液中にも $^3\text{H}$ の放射活性が認められ、その活性が占める割合は、投与直後の数%から5日後では95%以上に増加し、時間経過とともに増加する結果が見出された (data not shown)。このことは、HbVの脂質膜を構成するコレステロールとは異なる状態で別のコレステロールが存在する

ことを示しており、分解された後、血清リポタンパク質の脂質成分として存在する可能性を示唆している。このように、HbV由来のコレステロールは内因性のものと同様の経路で代謝排泄される可能性が高く、また14日程度でほぼ完全に消失するという結果から、緊急時に用いるものとして十分な代謝性を保持していると考えられる。

## E. 結論

HbVのマウスにおける体内動態特性を評価した結果、HbVは血中滞留性に優れるとともに、内部Hbは5日以内に、脂質成分は14日以内に体内からほぼ完全に消失することが明らかとなった。今回得られた知見は、これまで不明であったHbVの代謝・排泄過程を初めて明らかにし、有効かつ安全性に優れた人工赤血球製剤の開発に際し、重要な基礎資料になるものと考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. M. Otagiri. Amolecular functional study on the

- interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **20**, 309-323 (2005).
2. S.F. Ma, A. Anraku, Y. Iwao, K. Yamasaki, U. Kragh-Hansen, N. Yamaotsu, S. Hirono, T. Ikeda, M. Otagiri. Hydrolysis of angiotensin II receptor blocker prodrug olmesartan medoxomil by human serum albumin and identification of its catalytic active sites. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1911-1919 (2005).
  3. J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* **353**, 38-52 (2005).
  4. S. Saito, Y. Ando, M. Nakamura, M. Ueda, I. Kim, Y. Ishima, T. Akaike, M. Otagiri. Effect of nitric oxide in amyloid fibril formation on transthyretin - related amyloidosis. *Biochemistry* **44**, 11122-11129 (2005).
  5. K. Mera, M. Anraku, K. Kitamura, K. Nakajou, T. Maruyama, M. Otagiri. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 1322-1328 (2005).
  6. V.T. Chuang, M. Hijioka, M. Katsuki, K. Nishi, T. Hara, K. Kaneko, M. Ueno, A. Kuniyasu, H. Nakayama, M. Otagiri. Characterization of benzodiazepine binding site on human alpha1-acid glycoprotein using flunitrazepam as a photolabeling agent. *Biochim. Biophys. Acta.* **1725**, 385-393 (2005).
  7. K. Nishi, Y. Komine, N. Sakai, T. Maruyama, M. Otagiri. Cooperative effect of hydrophobic and electrostatic forces on alcohol-induced alpha-helix formation of alpha1-acid glycoprotein. *FEBS Lett.* **579**, 3596-3600 (2005).
  8. K. Nakajou, S. Horiuchi, M. Sakai, K. Hirata, M. Tanaka, M. Takeya, T. Kai, M. Otagiri. CD36 is not involved in scavenger receptor-mediated endocytic uptake of glycolaldehyde- and methylglyoxal-modified proteins by liver endothelial cells. *J. Biochem. (Tokyo).* **137**, 607-616 (2005).
  9. T. Deguchi, M. Takemoto, N. Uehara, W.E. Lindup, A. Suenaga, M. Otagiri. Renal clearance of endogenous hippurate correlates with expression levels of renal organic anion transporters in uremic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 932-938 (2005).
  10. H. Tahara, M. Shono, H. Kusuhara, H. Kinoshita, E. Fuse, A. Takadate, M. Otagiri, Y. Sugiyama. Molecular cloning and functional analyses of OAT1 and OAT3 from cynomolgus monkey kidney. *Pharm. Res.* **22**, 647-660 (2005).
  11. T. Deguchi, Y. Kouno, T. Terasaki, A. Takadate, M. Otagiri. Differential contributions of rOat1 (Slc22a6) and rOat3 (Slc22a8) to the in vivo renal uptake of uremic toxins in rats. *Pharm. Res.* **22**, 619-927 (2005).
  12. C.I. Kawasaki, R. Nishi, S. Uekihara, S. Hayano, U. Kragh-Hansen, C.I. Kawasaki, M. Otagiri. How tightly can a drug be bound to a protein and still be removable by charcoal hemoperfusion in overdose cases? *Clin. Toxicol. (Phila).* **43**, 95-99 (2005).
  13. T. Imai, M. Sakai, H. Ohtake, H. Azuma, M. Otagiri. Absorption-enhancing effect of glycyrrhizin induced in the presence of capric acid. *Int. J. Pharm.* **294**,

11-21 (2005).

14. T. Deguchi, K. Isozaki, K. Yousuke, T. Terasaki, M. Otagiri. Involvement of organic anion transporters in the efflux of uremic toxins across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* **96**, 1051-1059 (2006).

15. V.T. Chuang, M. Otagiri. Stereoselective binding of human serum albumin. *Chirality*. (2006) in press.

## 2. 学会発表

1. 安楽誠, 浦田由紀乃, 武岡真司, 土田英俊, 小田切優樹 / マウスにおけるヘモグロビン小胞体の血中滞留性と組織移行性について / 第 12 回血液代替物学会 / 2005. 6. / 東京

2. 浦田由紀乃, 安楽誠, 小松晃之, 土田英俊, 小田切優樹 / 組換え型アルブミン二量体の体内動態特性について / 第 12 回血液代替物学会 / 2005. 6. / 東京

3. M. Anraku, K. Mera, K. Kitamuta, T. Maruyama, Masaki Otagiri / BIOLOGICAL INFLUENCE OF HUMAN SERUM ALBUMIN OXIDATION IN HEMODIALYSIS / 第 20 回 JSSX-第 13 回 ISSX 合同学会 / 2005. 10. / Hawaii

4. Y Iwo, M. Anraku, M. Hiraike, M. Otagiri / ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS MAY CAUSE RENAL TUBULAR INJURY THROUGH INTRACELLULAR OVERGENERATION OF ROS / 第 20 回 JSSX-第 13 回 ISSX 合同学会 / 2005. 10. / Hawaii

5. K Kaneko, V.T.G. Chuang, K. Yamasaki, N.V.

Bhagaven, A. Suenega, M. Otagiri / EFFECT OF N-B TRANSITION AND THE ROLE OF HIS 146 IN LIGAND BINDING OF HUMAN SERUM ALBUMIN / 第 20 回 JSSX-第 13 回 ISSX 合同学会 / 2005. 10. / Hawaii

6. K. Nishi, Y. Komine, N. Fukunaga, T. Maruyama, M. Otagiri. / ELUCIDATION OF THE MECHANISM INVOLVED IN THE UNIQUE BETA-SHEET TO ALPHA-HELIX STRUCTURAL TRANSITION OF ALPHA<sub>1</sub>-ACID GLYCOPROTEIN. / 第 20 回 JSSX-第 13 回 ISSX 合同学会 / 2005. 10. / Hawaii

7. K. Nakajou, S. Horiuch, M. Sakai, K. Hirata, M. Takeya, M. Otagiri / CD36 IS NOT INVOLVED IN SCAVENGER RECEPTOR-MEDIATED EVDOCYTE UPTAKE OF GLYCOALDEHYDE AND METHYL GLYOXAL-MODIFIED PROTEINS BY LIVER EVENDORHELIAL CELLS / 第 20 回 JSSX-第 13 回 ISSX 合同学会 / 2005. 10. / Hawaii

8. 上野 恵, 福永直子, 西 弘二, 小田切優樹 / ヒト alpha<sub>1</sub>-酸性糖蛋白質バリエーションにおける薬物結合選択性について / 第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム / 2005. 11. / 京都

9. 原口望, 永井竜児, 中城圭介, 小田切優樹 / ヒト血清アルブミンの次亜塩素酸による新規翻訳後修飾経路の検討 / 第 26 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム / 2005. 11. / 京都

10. 金子健一, V.T.G. Chuang, 山崎啓之, N.V. Bhagaven, 末永綾香, 小田切優樹 / ヒト血清アルブミンの N-B 転移における His146 の関与 / 日本薬学会第 126 年会 / 2006. 3. / 仙台

11. 岩尾康範, 安楽誠, 北村健一郎, 平池美香子, 末永綾香, 小田切優樹 / 酸化修飾アルブミンの尿細

- 管間質障害に及ぼす影響／日本薬学会第 126 年会／2006. 3.／仙台
12. 下石和樹, 安楽誠, 北村健一郎, 小田切優樹  
／血中酸化ストレスに及ぼす尿毒症物質イン  
ドキシル硫酸 (IS) の影響／日本薬学会第 126  
年会／2006. 3.／仙台
13. 米良克美, 安楽誠, 北村健一郎, 小田切優樹  
／尿毒症物質フランジカルボン酸によるヒト  
血清アルブミンの酸化亢進機構について／日  
本薬学会第 126 年会／2006. 3.／仙台
14. 門脇大介, 安楽誠, 北村健一郎, 小田切優樹  
／血液透析患者における血中酸化ストレスに  
及ぼすオルメサルタンの影響／日本薬学会第  
126 年会／2006. 3.／仙台
15. 異島優, 赤池孝章, 小田切優樹／内因性リガ  
ンド結合が及ぼすヒト血清アルブミンの S-ニ  
トロソ化反応／日本薬学会第 126 年会／2006.  
3.／仙台
16. 西弘二, 福永直子, 芥照夫, 小田切優樹／大腸菌  
を用いた組換え型  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質の発  
現系の構築／日本薬学会第 126 年会／2006. 3.／仙  
台
17. 末永綾香, 上野恵, 福永直子, 村上由佳, 西弘二,  
小田切優樹／ $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質バリアン  
トにおける薬物選択性の機序解明／日本薬学会第  
126 年会／2006. 3.／仙台
18. 安楽誠, 新塘里奈, 北村 健一郎, 丸山 徹, 小田  
切優樹／酸化ストレスから診る血液透析患者にお  
ける鉄剤投与設計の妥当性について／日本薬学会  
第 126 年会／2006. 3.／仙台
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
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臨床検査医学 教授  
研究協力者 小峰 梨沙 慶應義塾大学医学部内科

研究要旨

Hb小胞体(HbV)が生化学的検査、凝固学検査測定系に与える影響をヒト血清及び血漿を用いて *in vitro* で検討した。ヒト血清または血漿8.5に対し1.5の割合でHbV分散液 ([lipid] = 7.1g/dl、[Hb] = 10.3g/dl)、Hbを内包しない空球小胞体分散液([lipid] = 5.1g/dl)、または生理食塩水を添加した(本条件は16年度に行った *in vivo* 投与実験の条件に相当する)。次いで、生化学的検査値、凝固学的検査値を測定した。さらにフィルターまたは超遠心分画法でそれぞれHbV、空球小胞体を除去した際の血清及び血漿についても検査しコントロール値(生理食塩水を添加しフィルターまたは超遠心分画処理を行わなかった場合の測定値)と比較した。その結果、(1) 生化学的検査においてはHbV、空球小胞体添加時ともに脂質系検査項目で上昇傾向が認められたが、これは小胞体の脂質成分によるものと考えられた。HbV添加時では総タンパク、LDH、クレアチニンが上昇、総ビリルビン、ALT、 $\gamma$ GTが測定不能となったがフィルター処理でこれらの影響は解消された。(2)凝固学的検査においてはHbV、空球小胞体添加時ともにVWF抗原、活性ともに低下、さらにHbV添加時でAPTT、PT、フィブリノゲン測定不能、ATの上昇傾向が見られたがこれらの影響は超遠心分画処理で解消された。以上より、HbVが影響を及ぼす検査項目が明らかになった。さらに血清、血漿中のHbVを除去することによって、これらの影響が解消されることが示唆された。

A. 研究目的

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巧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起こる。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。

本研究は、血液赤血球の安全性評価を目的とし、15年度は *in vitro* 研究としてヒト血液に Hb 小胞体 (HbV) を添加し、凝固線溶系や血小板機能への影響を、16年度は *in vivo* 研究としてラットに HbV を投与した際の血球、凝固線溶系、内皮障害、マーカーへの影響、出血時間、血栓形成能への影響を検討した。検討の結果、*in vitro*、*in vivo* 研究ともに血球、凝固線溶系への影響は殆ど認められなかったが、一部の比色法や比濁法を原理とする検査では異常値となることが明らかとなった。この原因として HbV 自体が検査測定系に影響を及ぼしている



ことが考えられた。そこで平成17年度はヒト血清及び血漿にHbVを添加し、HbVが検査測定系に及ぼす影響(干渉作用)を *in vitro* で検討した。また、干渉作用の回避法の検討のためHbVを添加した血清及び血漿からフィルター、超遠心分画法によりHbVを除去した後の血清及び血漿についても検査した。

## B. 研究方法

ヒト血液を真空採血管(ベノジェクト II、テルモ)にて採血し、遠心分離(3500G、10min、18°C)して血清または血漿(1/9(v/v)3.8%クエン酸ナトリウム入り)を得た。血清または血漿 8.5 に対して 1.5 の割合でHbV分散液([lipid] = 7.1 g/dl、[Hb] = 10.3 g/dl)、Hbを内包しない空球小胞体の分散液([lipid] = 5.1 g/dl)、または生理食塩水を添加し凍結させた後、生化学検査、凝固学的検査を行った(Table 1、SRL社に測定依頼)さらに、サンプル添加後の血清または血漿をフィルター(PALL、孔径 0.1µm)に通過させたもの、または 5×10<sup>4</sup>G、25min 超遠心分離した後の上清も同様に検査した。

Table 1 検査項目と測定原理

### <生化学的検査>

| 項目               | 測定原理       |
|------------------|------------|
| 総タンパク            | Biuret法    |
| アルブミン            | BCG法       |
| 総ビリルビン           | バナジン酸酸化法   |
| AST              | JSCC標準化法   |
| ALT              |            |
| LDH              |            |
| γGT              |            |
| LAP              |            |
| CPK              | JSCC標準化法   |
| コリンエステラーゼ        | Rate assay |
| 総コレステロール         | 酵素法        |
| エステル型コレステロール     |            |
| 遊離型コレステロール       |            |
| HDL-コレステロール      | 選択阻害法(直接法) |
| 中性脂肪(トリグリ)       | 酵素法        |
| 遊離型脂肪酸           |            |
| リン脂質             |            |
| 尿酸               | ウリカーゼPOD法  |
| 尿酸窒素             | ウレアーゼUV法   |
| クレアチニン           | 酵素法        |
| K+               | 電極法        |
| Ca <sup>2+</sup> | OCPC法      |
| 無機リン             | モリブデン酸直接法  |
| CRP              | ラテックス免疫比濁法 |

### <凝固学的検査>

| 項目      | 測定原理             |
|---------|------------------|
| APTT    | Langdell法(散乱光度法) |
| PT      | Quick一段法(散乱光度法)  |
| フィブリノゲン | トロンビン凝固時間法       |
| AT      | 発色合成基質法          |
| vWF活性   | ラテックス凝集反応        |
| vWF抗原   | 固定血小板凝集法         |
| TAT     | ELISA            |
| PAI-1   | ELISA            |

## C. 研究結果

### 1) Hb小胞体または空球小胞体が検査測定系に与える影響

(1) 生化学的検査(Table 2,4): HbVを添加した時の、総ビリルビン、ALT、γGTは測定不能、総タンパク、AST、LDH、カリウム、カルシウム、無機リンが溶血検体と判断された。しかし実際に測定値に影響があった検査項目はLDH、総タンパクであった。総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロール、リン脂質、総タンパク、LDH、クレアチニンに上昇傾向が見られた。特にLDHはコントロール値(生理食塩水添加時)と比較し2倍以上の上昇が認められた。またCPKでは低下傾向が見られた。一方、空球小胞体添加時ではHbV同様、総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロール、リン脂質、総タンパクに上昇傾向が見られ、総ビリルビンは測定不能と判断された。

(2) 凝固学的検査(Table 3,5): HbV添加時、APTT、PT、フィブリノゲンが測定不能と判断され、ATの上昇が見られた。また、HbV、空球小胞体添加時ともにVWF活性、抗原の低下が認められ、その低下の程度はHbV添加時の方が大きかった。

### 2) フィルター処理の効果(Table 2,3)

(1) 生化学的検査では生理食塩水添加血清のフィルター処理で中性脂肪が低下した。これに伴ってHbV、空球小胞体添加条件も中性脂肪の低下が見られた。しかし、その他のHbV、空球小胞体添加時に影響が見られた検査項目はフィルター処理を行うことで生理食塩水添加時と同様の検査値まで戻

った。

(2) 凝固学的検査ではコントロール（生理食塩水添加）に比し HbV、空球小胞体添加条件で APTT、PT 延長、フィブリノゲン、VWF 活性、抗原低下が認められた。より顕著であった。しかし、HbV 添加時に上昇していた AT はフィルター処理によって生理食塩水添加時と同様の値となった。

### 3) 超遠心分画処理の効果 (Table 4, 5)

(1) 生化学的検査では超遠心分画処理後の生理食塩水添加血清では検査値の変化は見られなかった。HbV 添加、空球小胞体添加条件ともに超遠心分画

処理後では総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロール、リン脂質に上昇が見られた。また総ビリルビンにおいては超遠心分画処理後も測定不能であった。HbV、空球小胞体添加によって影響のあったその他の検査項目においては超遠心分画処理後生理食塩水添加時と同様の値になっていた。

(2) 凝固学的検査においても超遠心分画処理後の生理食塩水添加血漿では検査値の変化は見られず、HbV、空球小胞体添加時に影響の見られた検査項目は生理食塩水添加時と同様な検査値となった。

Table 2 フィルター処理時の生化学的検査結果

| 項目           | 単位    | 血清   | 生食添加 | 生食添加<br>フィルター処理 | vesicle添加 | vesicle添加<br>フィルター処理 | HbV添加  | HbV添加<br>フィルター処理 |
|--------------|-------|------|------|-----------------|-----------|----------------------|--------|------------------|
| 総タンパク        | g/dl  | 7.2  | 6.2  | 6.2             | 7.3 ↑     | 6.2                  | 13.8 ↑ | 6.4              |
| アルブミン        | g/dl  | 4.6  | 3.9  | 3.9             | 4.1       | 3.9                  | 5      | 4                |
| 総ビリルビン       | mg/dl | 0.6  | 0.5  | 0.5             | ※         | 0.3                  | ※      | 0.3              |
| AST          | IU/l  | 22   | 19   | 19              | 17        | 17                   | 20     | 20               |
| ALT          | IU/l  | 15   | 13   | 13              | 10        | 12                   | ※      | 13               |
| LDH          | IU/l  | 203  | 169  | 173             | 163       | 133                  | 400 ↑  | 142              |
| γGT          | IU/l  | 23   | 18   | 19              | ※         | 19                   | ※      | 17               |
| LAP          | IU/l  | 105  | 91   | 91              | 91        | 95                   | 89     | 93               |
| CPK          | IU/l  | 190  | 164  | 163             | 162       | 146                  | 120 ↓  | 149              |
| コリンエステラーゼ    | IU/l  | 323  | 272  | 272             | 263       | 278                  | 280    | 278              |
| 総コレステロール     | mg/dl | 224  | 192  | 191             | 374 ↑     | 169                  | 480 ↑  | 182              |
| エステル型コレステロール | mg/dl | 167  | 143  | 142             | 260 ↑     | 126                  | 240 ↑  | 135              |
| 遊離型コレステロール   | mg/dl | 57   | 49   | 49              | 114 ↑     | 43                   | 240 ↑  | 47               |
| HDL-コレステロール  | mg/dl | 62   | 52   | 53              | 52        | 51                   | 50     | 53               |
| 中性脂肪 (トリグリ)  | mg/dl | 191  | 161  | 146 ↓           | 158       | 97 ↓                 | 159    | 99 ↓             |
| 遊離型脂肪酸       | mEq/l | 0.13 | 0.12 | 0.11            | 0.12      | 0.14                 | 0.14   | 0.2              |
| リン脂質         | mg/dl | 257  | 216  | 215             | 313 ↑     | 193                  | 363 ↑  | 206              |
| 尿酸           | mg/dl | 7.3  | 6.1  | 6.1             | 5.9       | 6.2                  | 5.8    | 6.2              |
| 尿素窒素         | mg/dl | 13.8 | 12   | 11.6            | 10.8      | 12.2                 | 9      | 11.2             |
| クレアチニン       | mg/dl | 1    | 0.83 | 0.79            | 0.83      | 0.83                 | 1.84 ↑ | 0.87             |
| K+           | mEq/l | 4.3  | 3.4  | 3.3             | 3.2       | 3.5                  | 3.3    | 3.4              |
| Ca2+         | mg/dl | 9.7  | 8.2  | 8               | 8         | 8.2                  | 8      | 8.3              |
| 無機リン         | mg/dl | 3.9  | 3.3  | 3.2             | 4.3       | 3.4                  | 3.1    | 3.4              |
| CRP          | mg/dl | 0.04 | 0.04 | 0.04            | 0.02以下    | 0.02以下               | 0.09   | 0.03             |

※測定不能

**Table 3** フィルター処理時の凝固学的検査結果

| 項目      | 単位    | 血漿   | 生食添加 | 生食添加<br>フィルター処理 | vesicle添加 | vesicle添加<br>フィルター処理 | HbV添加 | HbV添加<br>フィルター処理 |
|---------|-------|------|------|-----------------|-----------|----------------------|-------|------------------|
| APTT    | 秒     | 34.2 | 34.8 | 37.1 ↑          | 34.7      | 48.1 ↑               |       | 200以上            |
| PT      | 秒     | 11.0 | 11.4 | 11.8 ↑          | 11.6      | 19.0 ↑               | 測定不能  | 80以上             |
| フィブリノゲン | mg/dl | 169  | 141  | 92 ↓            | 133       | 29 ↓                 |       | 20以下             |
| AT      | %     | 99   | 80   | 83              | 79        | 90                   | 105 ↑ | 88               |
| VWF活性   | %     | 62   | 61   | 42 ↓            | 43 ↓      | 11 ↓                 | 27 ↓  | 7 ↓              |
| VWF抗原   | %     | 76   | 67   | 52 ↓            | 54 ↓      | 34 ↓                 | 37 ↓  | 28 ↓             |
| TAT     | ng/ml | 1.2  | 1.1  | 1.0以下           | 1.1       | 1.0以下                | 1.2   | 1.0以下            |
| PAI-1   | ng/ml | 28   | 25   | 22              | 21        | 24                   | 24    | 23               |

↑ : 上昇傾向が見られた項目

↓ : 低下傾向が見られた項目

**Table 4** 超遠心分画処理時の生化学的検査結果

| 項目               | 単位    | 血清   | 生食添加 | 生食添加<br>超遠心処理 | vesicle添加 | vesicle添加<br>超遠心処理 | HbV添加  | HbV添加<br>超遠心処理 |
|------------------|-------|------|------|---------------|-----------|--------------------|--------|----------------|
| 総タンパク            | g/dl  | 7.3  | 6.1  | 6.3           | 7.2 ↑     | 7 ↑                | 14.1 ↑ | 7.1 ↑          |
| アルブミン            | g/dl  | 4.8  | 4    | 4.1           | 4.1       | 4.3                | 5      | 4.4            |
| 総ビリルビン           | mg/dl | 0.4  | 0.3  | 0.3           | ※         | ※                  | ※      | ※              |
| AST              | IU/l  | 17   | 13   | 13            | 13        | 14                 | 10     | 15             |
| ALT              | IU/l  | 11   | 9    | 8             | 8         | 9                  | 0 ↓    | 9              |
| LDH              | IU/l  | 137  | 117  | 115           | 114       | 117                | 350 ↑  | 132            |
| γGT              | IU/l  | 28   | 24   | 24            | 23        | 24                 | 0 ↓    | 24             |
| LAP              | IU/l  | 107  | 92   | 93            | 92        | 95                 | 91     | 97             |
| CPK              | IU/l  | 91   | 76   | 79            | 78        | 81                 | 40 ↓   | 82             |
| コリンエステラーゼ        | IU/l  | 377  | 316  | 322           | 307       | 329                | 290    | 338            |
| 総コレステロール         | mg/dl | 135  | 114  | 115           | 289 ↑     | 208 ↑              | 363 ↑  | 168 ↑          |
| エステル型コレステロール     | mg/dl | 102  | 86   | 87            | 196 ↑     | 139 ↑              | 238 ↑  | 116 ↑          |
| 遊離型コレステロール       | mg/dl | 33   | 28   | 28            | 93 ↑      | 69 ↑               | 125 ↑  | 52 ↑           |
| HDL-コレステロール      | mg/dl | 54   | 46   | 47            | 45        | 48                 | 45     | 49             |
| 中性脂肪 (トリグリ)      | mg/dl | 45   | 36   | 35            | 36        | 36                 | 35     | 37             |
| 遊離型脂肪酸           | mEq/l | 0.17 | 0.14 | 0.15          | 0.15      | 0.17               | 0.19   | 0.24           |
| リン脂質             | mg/dl | 158  | 132  | 133           | 217 ↑     | 192 ↑              | 249 ↑  | 173 ↑          |
| 尿酸               | mg/dl | 7.4  | 6.2  | 6.3           | 6         | 6.3                | 5.8    | 6.6            |
| 尿素窒素             | mg/dl | 11.2 | 9.4  | 9.2           | 7.8       | 8.9                | 10     | 9.9            |
| クレアチニン           | mg/dl | 0.84 | 0.71 | 0.7           | 0.75      | 0.73               | 2.16 ↑ | 0.79           |
| K <sup>+</sup>   | mEq/l | 4.3  | 3.6  | 3.7           | 3.6       | 3.7                | 3.7    | 3.9            |
| Ca <sup>2+</sup> | mg/dl | 9.8  | 8.2  | 8.4           | 8.3       | 8.4                | 8.3    | 8.5            |
| 無機リン             | mg/dl | 3.4  | 2.8  | 2.8           | 4         | 3.6                | 2.1    | 3.3            |
| CRP              | mg/dl | 0.64 | 0.54 | 0.56          | 0.48      | 0.51               | 0.7    | 0.57           |

※ 測定不能

**Table 5** 超遠心分画処理時の凝固学的検査結果

| 項目      | 単位    | 血漿   | 生食添加 | 生食添加<br>超遠心処理 | vesicle添加 | vesicle添加<br>超遠心処理 | HbV添加 | HbV添加<br>超遠心処理 |
|---------|-------|------|------|---------------|-----------|--------------------|-------|----------------|
| APTT    | 秒     | 34.3 | 32.2 | 33.5          | 31.9      | 31.8               | 測定不能  | 33.3           |
| PT      | 秒     | 11.2 | 11.4 | 11.5          | 11.4      | 11.3               |       | 11.4           |
| フィブリノゲン | mg/dl | 191  | 159  | 162           | 150       | 169                |       | 174            |
| AT      | %     | 100  | 83   | 83            | 82        | 86                 | 107↑  | 89             |
| VWF活性   | %     | 86   | 70   | 81            | 57↓       | 73                 | 15↓   | 77             |
| VWF抗原   | %     | 80   | 69   | 69            | 58↓       | 67                 | 38↓   | 72             |
| TAT     | ng/ml | 1.4  | 1.4  | 1.3           | 1.2       | 1.3                | 1.3   | 1.4            |
| PAI-1   | ng/ml | 16   | 14   | 18            | 15        | 16                 | 17    | 16             |

↑：上昇傾向が見られた項目

↓：低下傾向が見られた項目

## D. 考察

### 1) 生化学的検査への影響

HbV または空球小胞体添加時において測定不能となった ALT、 $\gamma$ GT は、フィルター処理、超遠心分画処理後の血清で測定可能となり、総ビリルビンにおいてはフィルター処理で測定可能となった。いずれの値もコントロールと同様の値となっていたため、血清中の HbV 粒子の光吸収と光散乱(濁度)、また、空球小胞体の粒子の光散乱が比色検査、比濁検査の妨げになっていることが原因と推測される。HbV 添加時の CPK の低下原因も同様なことが考えられる。また総タンパク、クレアチニン、LDH の上昇についてもフィルター及び超遠心分画処理でコントロールと同様な値となった。この場合は測定に用いる特定の波長の光を HbV が吸収し、吸光度が実際の血清中の値よりも高く測定されていることが考えられる。LDH に関しては HbV 添加時のアイソザイムも測定したが分布は正常パターンであり、HbV に赤血球由来の LDH が混入した可能性は低いと考えられた。総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロール、リン脂質の上昇は HbV 及び空球小胞体添加時において認められた。これらの検査値の上昇はフィルター処理でコントロール値と同様な値となった。

小胞体の組成から考えるとこれらの上昇は小胞体成分に起因することが考えられる。また超遠心分画処理では検査値の上昇は解消されなかったため、分離が不十分であることが示唆された。フィルター処理を行った全ての条件に中性脂肪の低下が見られたがこれは中性脂肪がフィルター上にトラップされていることが推測され、HbV 添加血清は中性脂肪測定において処理は必要ないと思われた。

### 2) 凝固学的検査への影響

HbV を添加した際の、APTT、PT、フィブリノゲンが測定不能になったこと、VWF 活性、抗原ともに低下したこと、また、生化学的検査と同様に超遠心分画処理で HbV 除去によりこれらの項目が測定可能となったことから、HbV の光吸収が検査過程の吸光度測定に影響していると考えられる。AT の上昇もフィルター処理及び超遠心分画処理によってコントロールと同様な値となったため、吸光度測定時の影響と考える。凝固学的検査でのフィルター処理の問題点としてはフィルター通過後の生理食塩水添加血漿において APTT、PT の延長、フィブリノゲン、VWF 活性、抗原の低下が認められたことである。延長した APTT、PT は凝固因子の減少を意味しており、この結果から凝固因子、