

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 15 年度～17 年度 総合研究報告書

主任研究者 小林 絃一  
(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 18 (2006) 年 4 月

目次

I. 総合研究報告書 .....1～110

小林 紘一（慶應義塾大学 医学部 外科 教授）

II. 研究成果の刊行に関する一覧 .....111～131

III. 研究成果の刊行物・別冊 .....132

## 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 慶応義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授

**研究総括** 本研究では、体内での呼吸活動に伴う酸素需要に相当する充分量の酸素を有し、感染源や血液型が無く、安定度の高い人工赤血球（ヘモグロビン小胞体: HbV）について、その安全性に関する評価方法を確立すると共に、これを使用したHbVの安全性確認および安全性を向上させるための研究を実施することを目的としている。期限切れ赤血球から精製した高純度/高濃度Hb溶液をリン脂質二分子膜で被覆したHbV（粒子径250 nm）は、厚生労働科学研究（平成9～14年度、研究代表者：土田英俊）として、主に物性規格の決定、製造方法の効率化、齧歯類を用いた効能と安全性に関する評価を中心に検討された。HbVは、末梢組織への酸素運搬を満足する物性規格を持ち、室温にて2年間の保存が可能、修飾Hbと比較して赤血球と類似の小胞構造により安全度の極めて高い製剤として評価されてきた。これらの成果を受けて本研究班（平成15～17年度）では、実施企業にHbV製造技術の移転を行い、GLP（Good Laboratory Practice）のレベルで委託製造されたHbVを対象とし、動物投与試験を行って輸血の補完のできる輸液製剤としての安全性を確認すると共に、従来に無い大量投与を伴う新しい範疇の医薬品として、GMP（Good Manufacturing Practice）基準の試料製造、非臨床試験、臨床試験への移行が円滑となるよう、先見的学術研究を実施した。第一期（平成15年度～17年度）の3年間で得られた成果は以下の通り。

① 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、50%出血性ショックモデル（ビーグル）を作成し、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）の投与試験を実施した。脾臓摘出の有無に拘らずHbV/rHSA分散液は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、蘇生直後に肺動脈圧が一時的に上昇することが認められた。機序については種差の影響も含め検討を要する。酸素運搬は23～27%前後がHbVで分担されており、酸素運搬も十分に行われていることが明らかとなった。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い。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。今後は長期生存実験を行い、安全性を確認することが重要である。② HbVの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。HbVの連続投与においても血中補体価は一過性に低下するものの、生理食塩水の投与と同程度まで回復した。さらに空の小胞体を一定間隔で3回投与したがアナフィラキシー（様）反応は無かった。またHbV投与後、一過性に脾細胞の非特異的刺戟（Con A）

に対する応答性の低下、Keyhole Limpet Hemocyaninに対する抗原特異的な二次応答反応も低下した。この原因としてT細胞が一過性のアナジー状態となっていること、またNOが一部関与していることが示唆された。応答性の低下は一過性であり投与7日後には定常状態に復しており、細胞性免疫の一時的な抑制効果と考えられた。他の細胞についての実験や、機序の検討が今後必要である。③ 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、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overnight、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。これらはいくまで*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。④ 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。⑤ HbVが血球や血液凝固線溶系に及ぼす影響を検討することを目的とし、HbVを血液に添加する*in vitro*研究や、ラット脱血モデルにHbVを投与する*in vivo*研究を実施した。血球、凝固線溶系への大きな変化は認められなかった。一部の比色法や比濁法を原理とする生化学的、血液学的検査ではHbVの干渉作用による異常値が認められたので、血清および血漿中のHbVの除去をフィルタ法、超遠心分画法により実施したところ、干渉作用の影響が解消された。臨床現場では血液検体からHbVを分離する前処理を行うなど検査時に注意が必要である。⑥ 放射化標識した<sup>99m</sup>Tc-HbVを利用し、血中半減期や代謝臓器に関する詳細知見を得た。血中半減期は2~3日に調整でき、肝臓や脾臓など代謝臓器への捕捉により血中から消失した。⑦ HbV構成成分のうち、内部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 (<sup>125</sup>I-HbV及び<sup>3</sup>H-HbV)を用いて体内動態解析を行った。Hbは小胞体化することにより、消失半減期は約30倍、AUC (血漿濃度曲線下面積)は約4倍に増加し、血中滞留性の向上が認められた。内部Hb (<sup>125</sup>I-HbV)の分布、代謝臓器は主に肝臓及び脾臓であり、これらの取り込み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明らかとなった。膜構成コレステロール(<sup>3</sup>H-HbV)は肝臓、脾臓で分解された後、血清リポタンパク質として血漿中に存在し、投与後14日以内には約70%が胆汁中から糞中へ排泄された。⑧ HbV投与による臓器機能への影響について微小循環レベルでの検討を行った。(i) ラット脱血性ショックモデルにおいて、HbV投与により全身血圧の完全な回復と、効果の持続とともに胆汁排泄機能の改善効果が認められた。(ii) マウス一過性脳虚血モデルにおいては虚血再灌流後に認められた局所血管透過性亢進が空小胞体投与により著しく改善し、付加的な機能を有する可能性があること、さらに、(iii) HbV投与後のメタボローム解析では、肝臓内ATP含量の低下とそれに伴ったNAD/NADHの増加が、またグルタチオン、タウリン、ヒポタウリンの低下など含硫アミノ酸代謝の変動を認め、肝エネルギー代謝に一過性の影響があることが明らかになった。⑨ HbVをラット

に単回投与(20mL/kg)したところ、全例が1年生存した。血液生化学検査、組織病理学的検査では、HbVに起因する異常は確認されなかった。⑩ HbV/rHSA分散液を用い、ラット循環血液量の40%を交換したところ、Hctは1週間で完全に回復した。老化赤血球と同様にHbVがマクロファージに捕捉分解されることと、造血作用が、一過性の脾臓肥大をもたらしたと考えられた。⑪ ラット出血性ショックモデルに対し、HbV/rHSA分散液を投与したところ、血行動態、血液ガス組成は脱血液の投与と同等に速やかに回復し、その後二週間安定に推移した。また、Hctは1週間でほぼ完全に回復した。アンタイボディオミクス法では、HbV投与による顕著な炎症性サイトカイン放出が無いことを確認した。⑫ HbVの脳神経系に与える影響について検討した。ラット虚血脳障害により血液脳関門の透過性が亢進しても、HbVはこれを透過しなかった。正常ラットの側脳室にHbVを直接注入(20 $\mu$ l)したところ、行動学的変化を認めなかった。⑬ HbVを各種代用血漿剤に分散させて溶液粘弾性を測定した。デキストラン、高分子量ヒドロキシエチルスターチ(Mw. 200 kDa)、修正ゼラチンに分散させた場合では、粘度の上昇が確認された。⑭ HbVの一酸化炭素(CO)、一酸化窒素(NO)結合速度をストップフロー法により測定した。HbVのCO結合速度は非細胞型Hb溶液(SFHb, polyHb)と同等であったが、NO結合速度は約1/4と顕著に遅く、HbVの構造が細胞型である効果が確認された。⑮ HbVは細網内皮系にて捕捉代謝される。脾臓の微小循環動態(血流速度)は、投与1日後には低下するが、3日後には完全に回復した。組織病理学的には捕捉されたHbVの像が見られる以外は微小血管系に障害は認められなかった。⑯ 臨床検査装置によりHbV分散液のHb濃度を測定したところ、HbVの干渉作用のみられる機種があった。また干渉作用の少ない機種も、今後より正確な値を得る為に装置の工夫あるいは検体の前処理の必要性が明らかになった。⑰ 平成14年度までのHbV製造に関する基本技術の確立を受け、実施企業に製造法の技術移転を実施した。平成15～16年度では数リットル/バッチでの調製により、物性値の再現性のほか無菌性を確認すると共に、分担研究者に対し安全性試験のための試料を供した。⑱ 早稲田大学よりHbVの製造法の技術移転を完了し、製造量(5～6リットル/バッチ)、品質ともに安定したHbVを実施企業で製造できるようになった。またスケールアップしたHbVの製造工程を確立し、その条件で製造されたHbVの規格値の再検討を行った。⑲ HbVの工業化に向け、治験薬製造プラントに導入可能な装置の作成およびシステムの構築を目的とし、HbV製造工程で重要な脱CO化装置の設計と作成した。また最終の充填工程で溶存酸素が十分に除去されていること、粒径分布に再現性があることを確認し、GMP基準での製造に向けた準備作業を進めた。⑳ HbVの非臨床試験を開始するための前準備として、(i) カニクイザルに対しHbVの単回負荷投与(～20 mL/kg)試験を実施した。2週間の経過観察において変化のみられた主な項目は、血清コレステロール、フェリチン濃度の高値傾向であった。また、血小板数と血小板機能に殆ど影響は無かった。(ii) 臨床応用時の用法・用量の根拠とすべく、GLP(安全性)および信頼性保証下(薬効、体内動態)の非臨床試験項目及びそれらのプロトコール(案)を策定し、予備検討を開始した。㉑ 国内外の研究施設、救急医学会の協力を得て、HbVの前臨床試験法とその安全性、有効性の確認法について調査した。臨床

での使用量を想定して、5～10mL/kgの血液交換、あるいは40 mL/kgの出血性ショックを想定した使用量を基準とすること、また体外循環回路内充填液としての利用がまとめられた。HbV生産工程の無菌状態の確保を確認し、GMP基準に従った製造の準備が整っている。工業生産をふまえて、HbV製造の基本的留意事項を作成した。

本研究班では、人工赤血球の「安全性」を先見的学術的立場から確認する研究を推進してきた。この人工赤血球の臨床での使用範囲の拡大については、厚生労働科学研究課題「救急・災害医療に利用可能な人工赤血球に関する研究」(主任研究者：慶応義塾大学医学部 四津 良平 教授)の研究班で詳細が検討され、体外循環回路補充液、出血性ショック蘇生液、虚血性疾患に対する酸素治療薬などの利用が可能であることが実証されている。

以上のように本研究では、人工赤血球の安全性に関する研究を行い、輸血を補完できる輸液製剤として安全に使用できることを実証するに足る結果を動物投与試験から具体的に明示することができた。今後 GMP 基準で製造された製剤について非臨床試験、臨床試験に移行すべき期待度の高い製剤であることが確認され、第一期(平成 15～17 年度)当初の目標を完了させた。第二期(平成 18～20 年度, 申請中)では、「人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究」として、従来に無い新しい人工赤血球製剤の性質を熟知した研究者が実施企業と連携して、基礎、臨床の立場から安全性を追求し、第一相試験を学術的に主導するとともに、大量投与量も予想される第二・三相試験を想定した動物試験での安全性・有効性を確認し、開発を加速させる予定である。

## 分担研究者

池田 久實	北海道赤十字血液センター 所長 (H15-17 年度)
小田切 優樹	熊本大学大学院 医学薬学研究部 教授 (H15-17 年度)
村田 満	慶應義塾大学 医学部 臨床検査医学 教授 (H15-17 年度)
合田 亘人	慶應義塾大学 医学部 医化学教室 講師 (H15-17 年度)
高折 益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長 / 川崎医大名誉教授 (H15-17 年度)
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 (H15-17 年度)
甲斐 俊哉	ニプロ(株) 医薬品研究所 製剤研究室 室長 (H16-17 年度)
須賀 裕子	(株)オキシジェニクス 京都研究所 主任研究員 (H16-17 年度)

## 研究協力者

堀之内 宏久	慶應義塾大学 医学部 外科 講師
渡辺 真純	慶應義塾大学 医学部 外科 助手
泉 陽太郎	慶應義塾大学 医学部 外科 助手
山本 学	慶應義塾大学 医学部 外科 助手
池田 達彦	慶應義塾大学 医学部 外科 助手
東 寛	北海道赤十字血液センター 研究部 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
安楽 誠	熊本大学大学院医学薬学研究部 研究員
小峰 梨沙	慶應義塾大学 医学部 内科
菅沼 和弘	慶應義塾大学 医学部 医化学教室 助手
梶村 真弓	慶應義塾大学 医学部 医化学教室 助手
武岡 真司	早稲田大学 理工学術院 教授
酒井 宏水	早稲田大学 理工学総合研究センター 助教授
宗 慶太郎	早稲田大学 理工学総合研究センター 助教授
西田 誠司	ニプロ(株) 医薬品研究所 製剤研究室 主席研究員
片山 直久	ニプロ(株) 医薬品研究所 製剤研究室 主席研究員
太田 勝次	(株)オキシジェニクス 横浜研究所 所長

## 1. ビーグル犬を用いた出血性ショックモデルにおける Hb 小胞体の蘇生効果および酸素運搬機能の評価

### A. 研究目的

人工赤血球である Hb 小胞体(HbV)は、静脈内投与された後、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、臨床応用に向けてこれまでに動物投与試験から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。試料製造は大学の研究室レベルでは大量に製造を行うだけのスペースや人的資源を確保することが困難で、中型動物への投与を行うための試料製造が難しかった。しかし平成 16 年度には、HbV 試料を実施企業(株オキシジェニクス)に製造を委託し、GLP レベルの均質な HbV を比較的大量に製造し供給できる体制が整い、中型動物(ビーグル犬)での実験を行うことが可能となった。中動物での実験は臨床での使用を想定したモデルを作成し、従来小動物では測定困難であった、全身での酸素代謝、右室系の変化について検討し、酸素運搬機能、安全性について検証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。平成 15 年度は対照群の設定のため以下の群に分けて実験を行った。

(ア) 循環血液量の 40%を脱血、30 分経過観察後に出血と同量の輸液を行う。

(イ) 循環血液量の 50%を脱血、30 分経過観察後に出血と同量の輸液を行う。

(ウ) 脾摘を行い、計算で求めた循環血液量の 50%

を交換輸血の手技を用いて 5%リコンビナントアルブミン生理食塩水溶液(rHSA)にて希釈した後 40%の脱血を行い、1 時間の間隔をおいて出血と同量の輸液を行う。

(エ) 脾摘を行い、計算で求めた循環血液量の 70%を交換輸血の手技を用いて rHSA にて希釈した後 30%の脱血を行いショックとした後に 30 分の間隔をおいてから出血量と同量の輸液を行う。

平成 16、17 年度は前年度の実験結果を踏まえて、循環血液量の 50%を脱血して出血性ショックのモデルにて実験を行った。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、これを実験開始前に摘出する必要があった。そのため平成 16 年度は脾臓摘出後に 50%脱血ショックとするモデルにて実験を行った。一方、平成 17 年度は代謝臓器としての脾臓の機能を考慮し、蘇生液の安全性の検討のため脾臓の摘出は行わなかった。

腹部正中切開下に脾臓を摘出し、同時に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。脾臓は摘出直後に重量を測定し、室温で放置、自然に収縮させ、30 分後に再び重量を測定、この差を脾臓内血液量として記録した。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、針型酸素電極 (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。この際、脾摘時に測定した脾臓内血液量を差し引いた値を脱血量とした。

脱血に従い血圧の低下を認め、50 mmHg 以下になったことを確認した後、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。50 mmHg を上回るときには 50 mmHg 以下になるように追加の脱血を行なった。

脱血ショック状態を 1 時間継続した後、Lactate Ringer 溶液 (LR 群)、5%アルブミン溶液 (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%rHSA 溶液に分散した液体。Hb 濃度は 8.6 g/dl: HbV 群) を用いて蘇生を行った。蘇生は 20 ml/min の投与速度で上肢の静脈ラインより経静脈的に投与した。蘇生液の容量は脱血量と等量とした。

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試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

<平成 15 年度>

50%脱血犬で比較してみると、予め脾摘を行った

モデルでは、脱血直後の血圧の低下が著しく、ショック維持時間中の血圧の回復を認めるが、その程度は脾摘を行わない動物に比して軽度であった。この事実は、脾臓の収縮により、プールされていた赤血球が血中に現れたと考えられ、出血ショックの実験を行う際には脾摘を行うことに合理性があることが明らかとなった。また、脱血前に脾摘を行い脾臓の重量を計測すると、120g 程度の重量があったが、実験終了後に脱血犠牲死させ、臓器を摘出した際には脾臓の重量は 20g から 30g となっており、血圧の低下に伴って脾臓が収縮していることが明らかとなった。

出血量については、70%希釈を行った動物は出血性ショック作成後循環動態が維持できず死亡した。

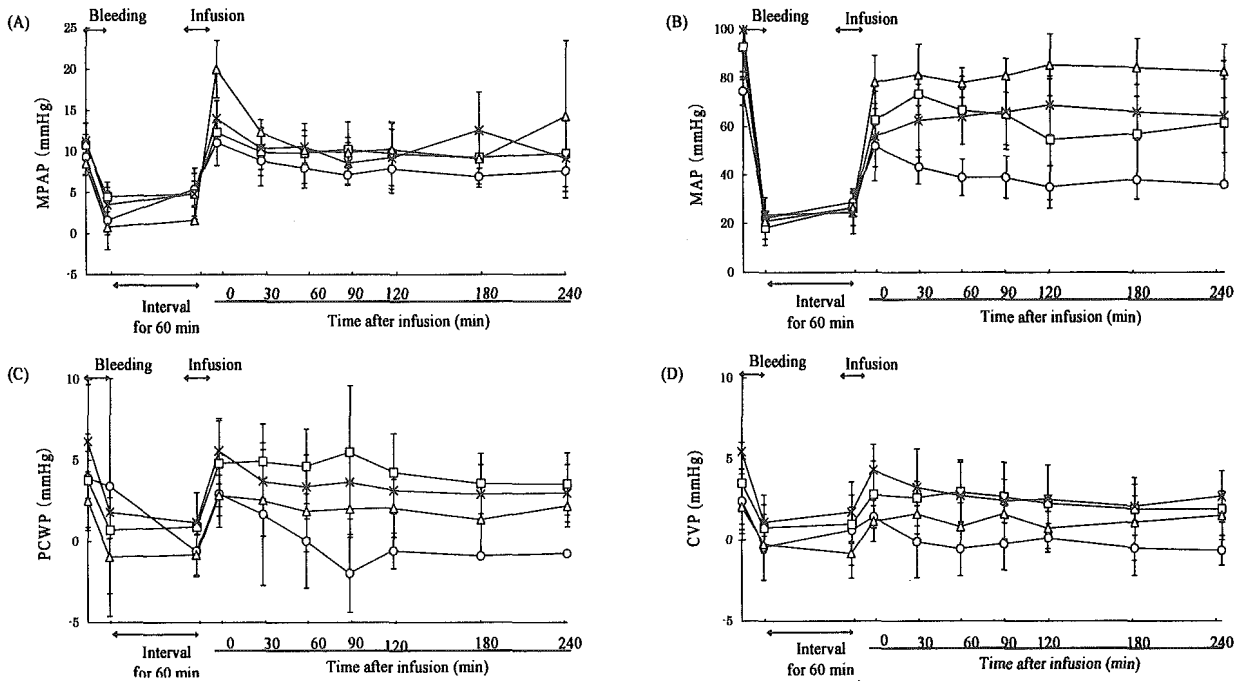
以上の結果から HbV の安全性と効果を同時に検討するためには 50%脱血を行い、血圧の低い (最高血圧が 50 mmHg を超えない) 状態を 1 時間維持した後に失われた量と同量の補液を行うプロトコールが評価を行う上で有効であろうと考えられた。

<平成 16 年度 (以下①)>

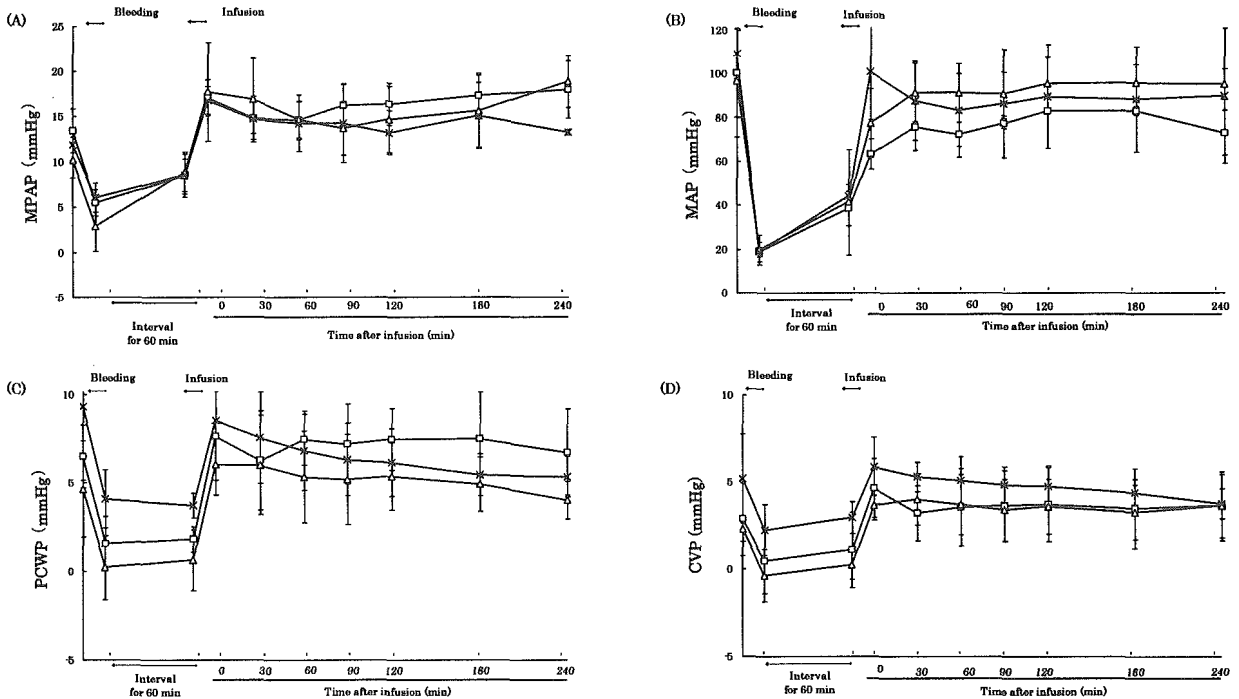
および平成 17 年度 (以下②) >

### 1. 血圧、肺動脈圧、CVP、PCWP の変化

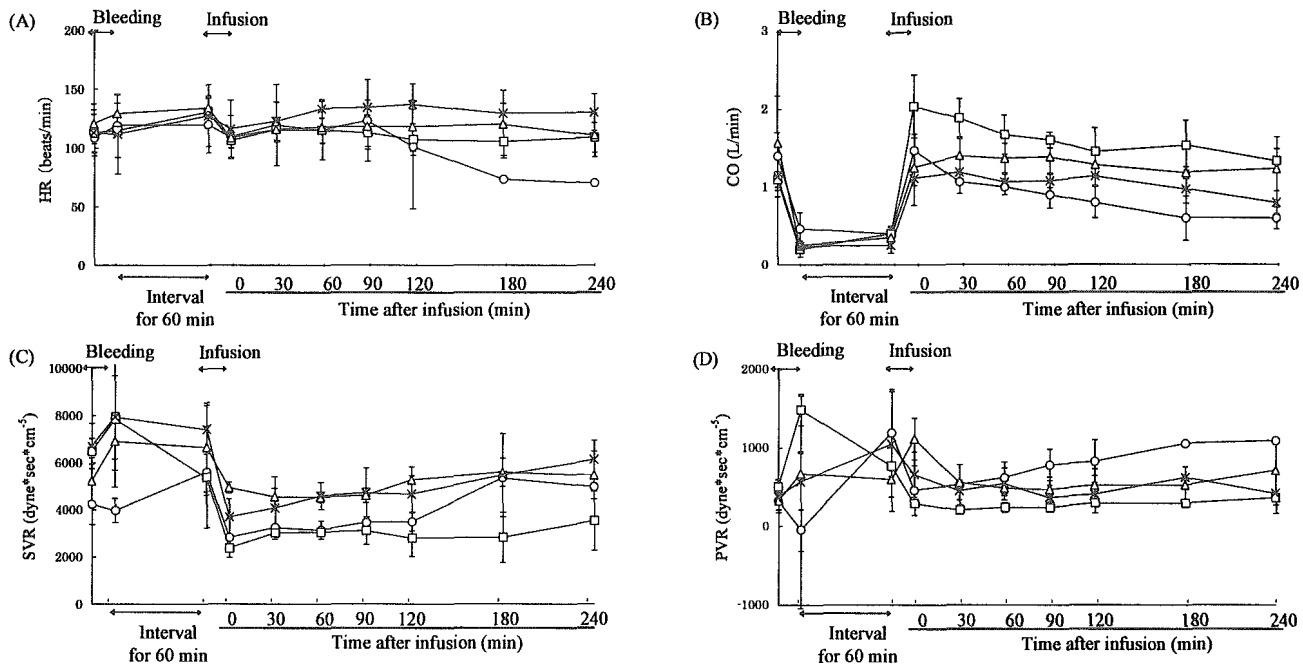
① (Fig.1) 平均血圧は LR 群 (Lactate Ringer 溶液) では蘇生後低い値で経過し、他の 3 群 (ASB 群、rHSA 群、HbV 群) では有意差を認めなかった。平均肺動脈圧は HbV 群で投与直後他の 3 群と比較して有意に高値であったが、30 分後には他の群と有意差のない状態となって推移した。PCWP は脱血後低下し、蘇生後上昇し、術前値と有意差のない状態に復したが、LR 群では蘇生後徐々に低下したのに対し、他の 3 群では、蘇生後の変化に有意差を認めなかった。CVP の変化に 4 群間の有意差は認めなかった。



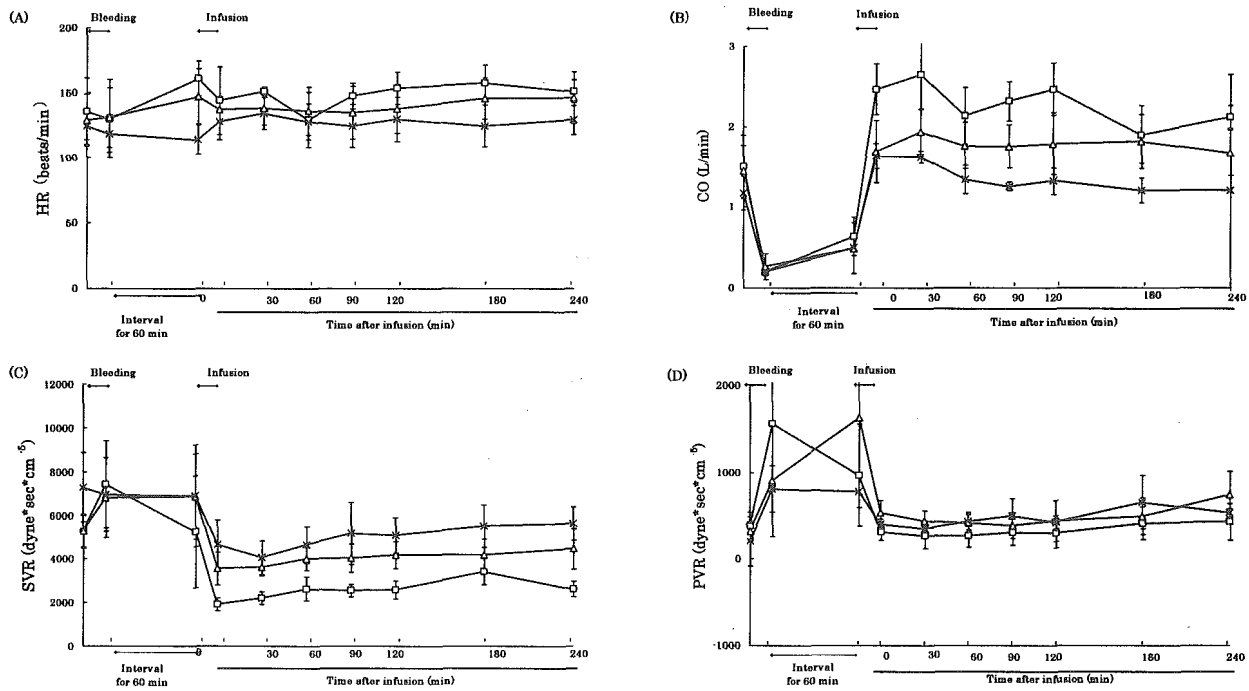
**Fig. 1.** Effects of lactate Ringer's solution (lactec), recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on mean pulmonary arterial pressure (MPAP) (A), mean arterial pressure (MAP) (B), pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) (C) and central venous pressure (CVP) (D)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



**Fig. a.** 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 lactate Ringer's solution (lactec), 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. (○; lactec group, □; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group).



**Fig. b.** 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).

② (Fig. a) 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 群とも蘇生後に上昇し、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

① (Fig. 2) 心拍数は脱血後上昇し、蘇生により術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が、LR 群では血圧の低下と同様蘇生後 180 分から心拍数が減少した。心拍出量は出血ショックに伴い 0.3 L/min に低下したが蘇生に伴い脱血前値に復した。rHSA 群では hyperdynamic となり、時間の経過とともに心拍出量の減少が観察された。LR 群では蘇生によりショック前値に復したが、時間の経過とともに減少し、240 分後には蘇生直後の値との間に有意差を認めた。

体血管抵抗は HbV 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 群と LR 群では蘇生後 SVR は低下し、LR 群では脱血前値に回復することはなかったが、rHSA 群では時間の経過とともに脱血前値に復した。肺血管抵抗は HbV 群で、投与後著しい上昇を示したが、一時的な上昇であり、30 分後には ASB 群と有意差を認めなかった。LR 群では蘇生後緩徐に上昇し、180 分以降脱血前値との間に有意差を認めた。

② (Fig. b) 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 L/min 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。

## 3. 血液ガス所見

① (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。しかし混合静脈血酸素飽和度は蘇生後 LR 群で一貫して低値であった。これは単位血液あたりの Hb 量が少ないために末梢組織での extraction が亢進しているためと思われる。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。

② (Fig. c) 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。

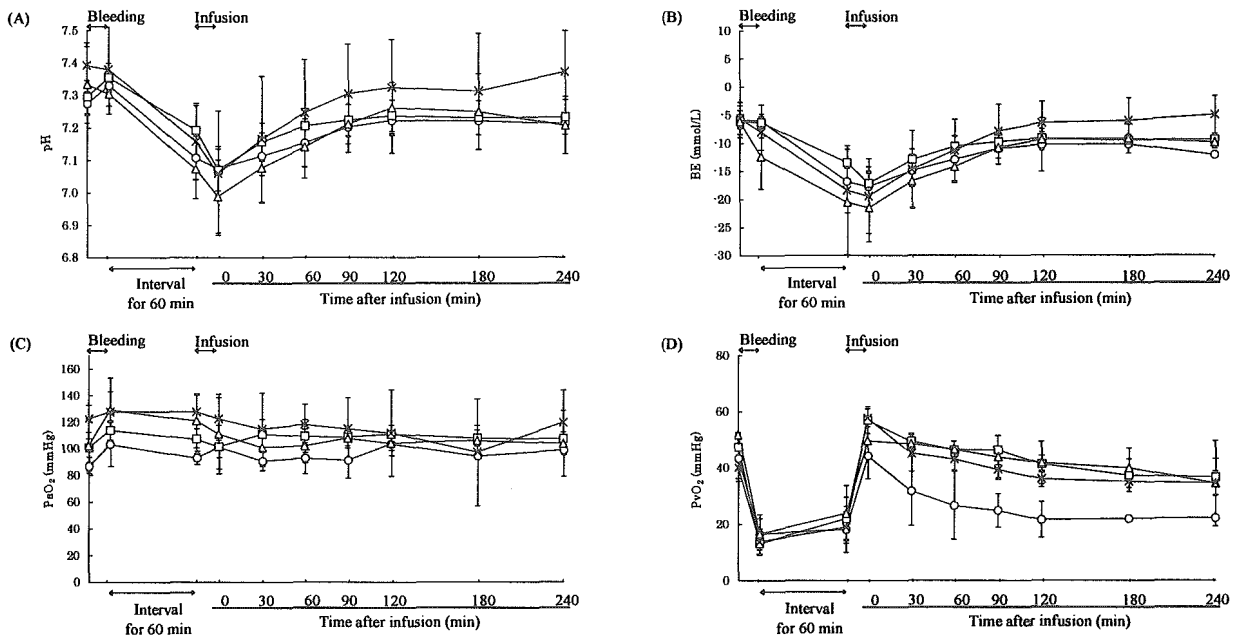
## 4. 腎組織酸素分圧、大脳皮質内血流酸素飽和度、腹直筋内血流酸素飽和度

① (Fig. 4) 腎皮質酸素分圧の推移では蘇生後 ASB 群でもっとも良好な経過を示した。HbV 群でも蘇生後に皮質酸素分圧の上昇を認め、ASB 群との間に有意差はなかった。LR 群では蘇生後の腎皮質の酸素分圧の上昇は軽微で ASB 群との間に有意差を認めた。

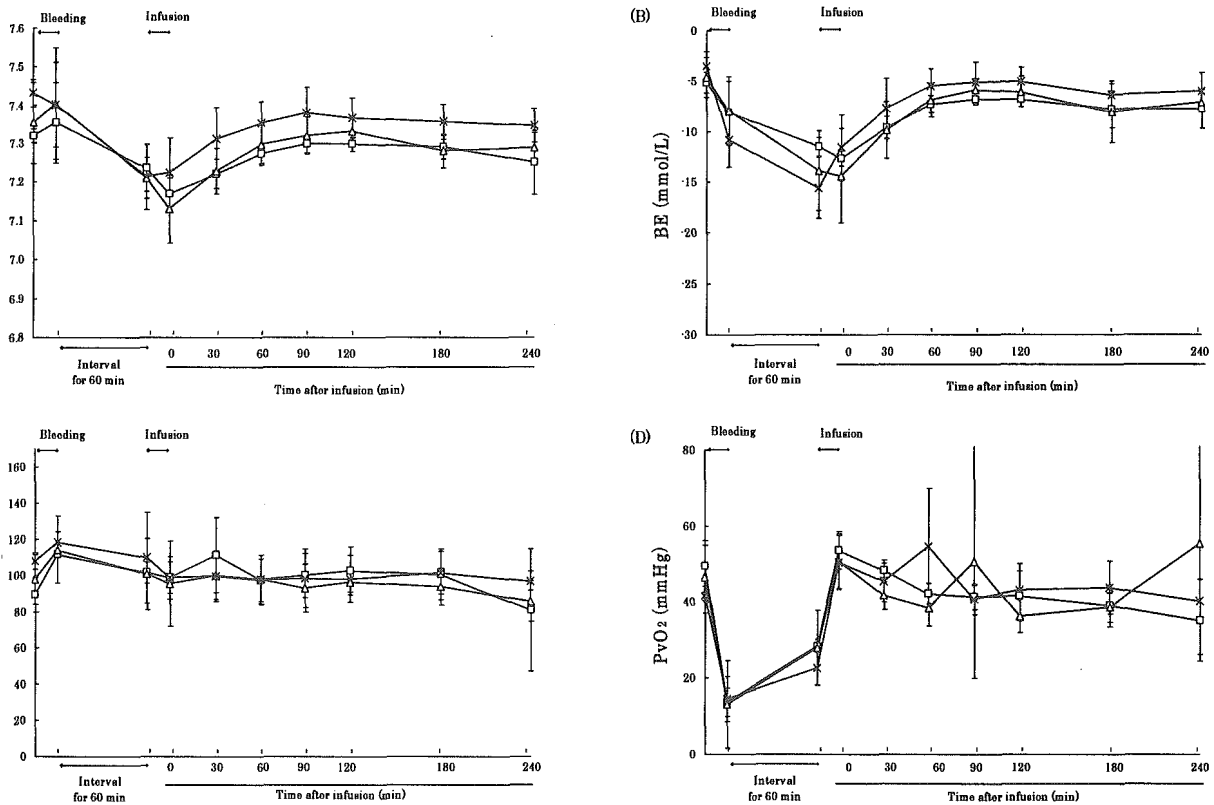
大脳皮質酸素分圧は LR 群で低い値で経過したが、他の 3 群 (ASB 群、HbV 群、rHSA 群) では同様の経過を示した。腹直筋内血流酸素飽和度も LR 群で低い値で推移したが、他の群では同様の経過であった。

② (Fig. d) 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。

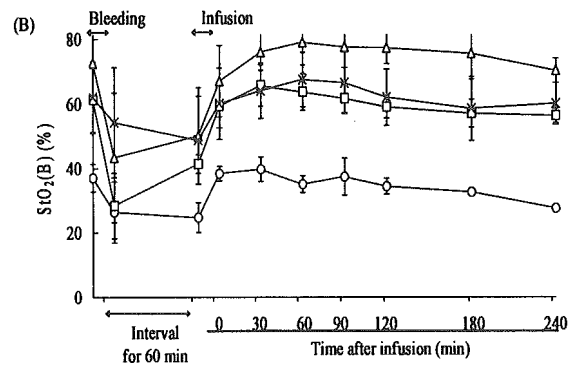
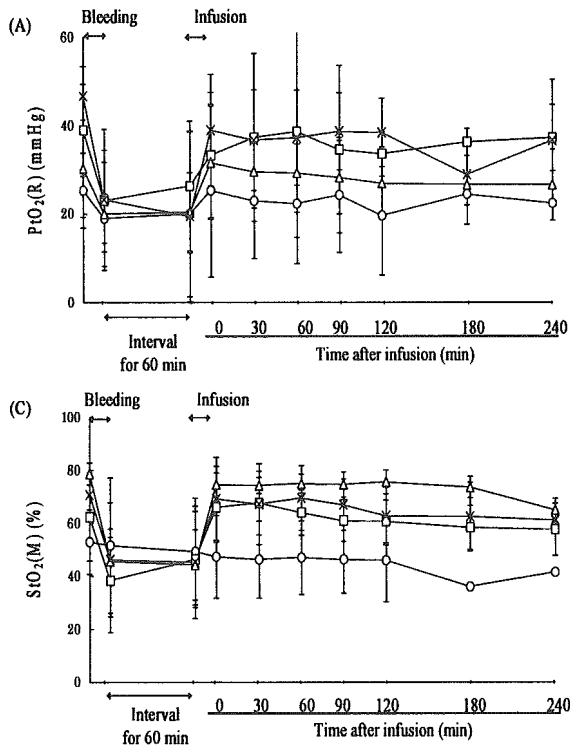
大脳皮質酸素分圧、腹直筋内血流酸素飽和度は全群間で有意差を認めなかった。



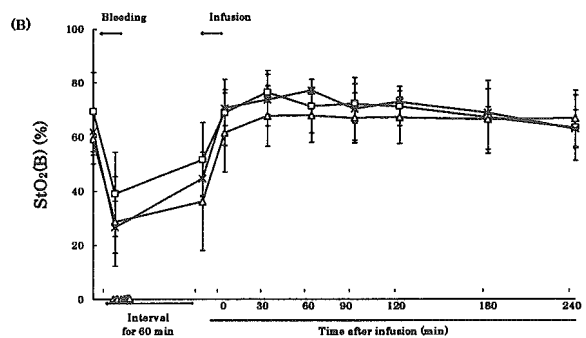
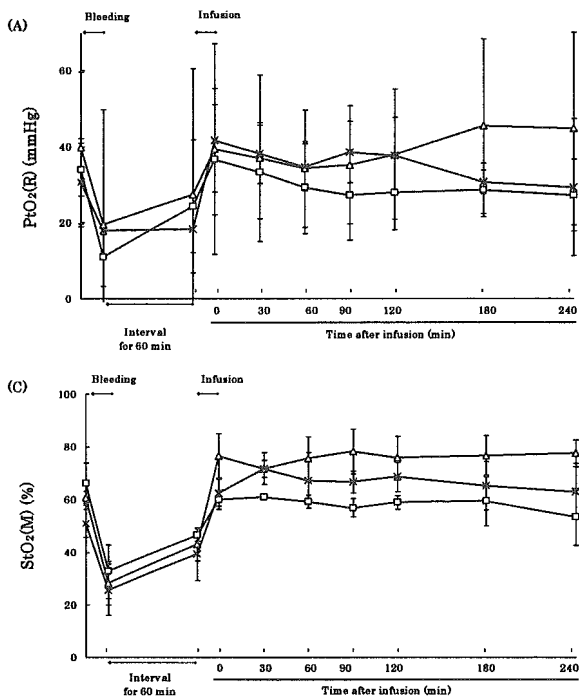
**Fig. 3.** Effects of lactate Ringer's solution (lactec), recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on blood pH (A), base excess (BE) (B), arterial blood O<sub>2</sub>-tension (PaO<sub>2</sub>) (C) and venous blood O<sub>2</sub>-tension (PvO<sub>2</sub>) (D) in anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (○; lactec group, □; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group)



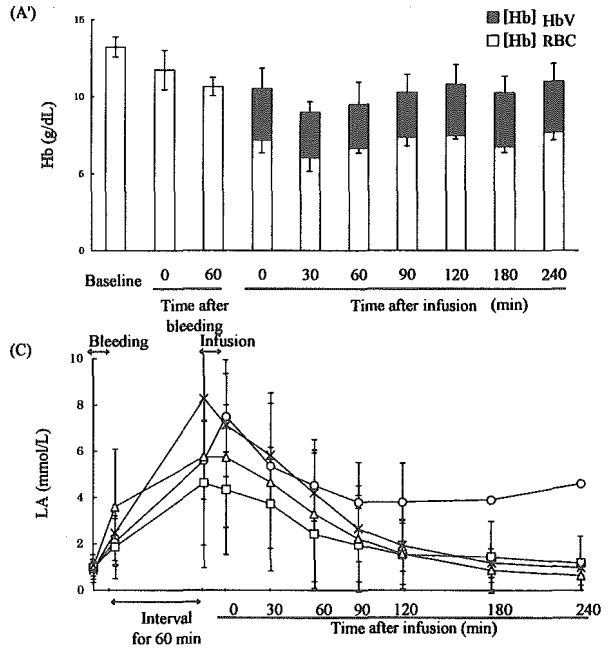
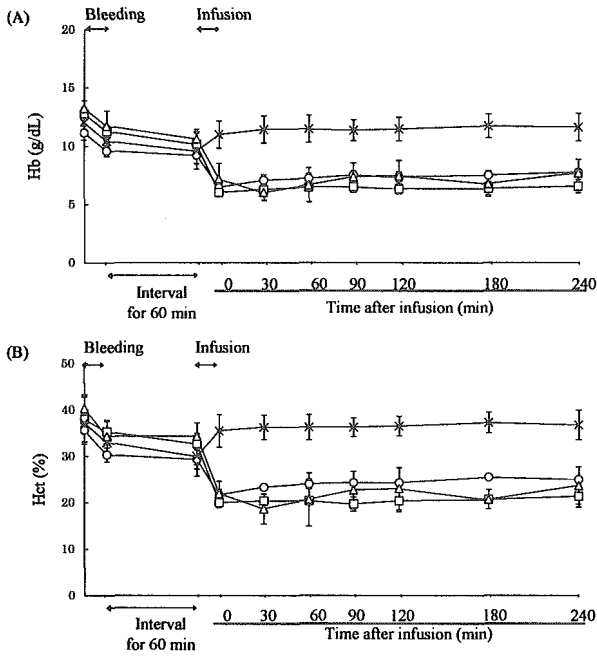
**Fig. c.** Effects of recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and hemoglobin vesicle (HbV/rHSA) on blood pH (A), base excess (BE) (B), arterial blood O<sub>2</sub>-tension (PaO<sub>2</sub>) (C) and venous blood O<sub>2</sub>-tension (PvO<sub>2</sub>) (D) in anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (□; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group).



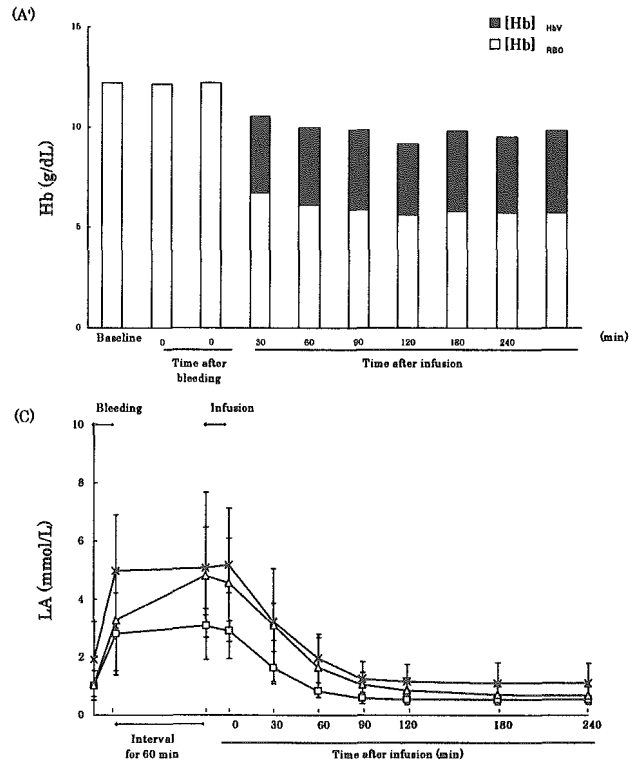
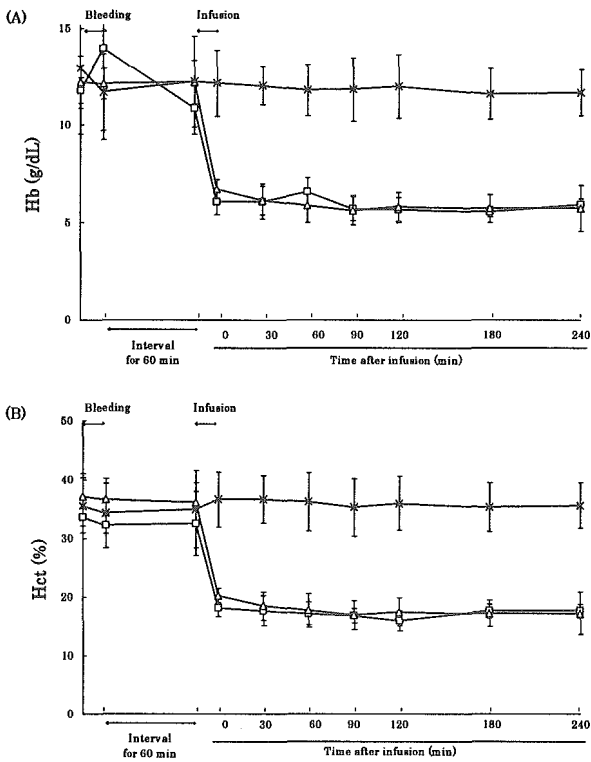
**Fig. 4.** Effects of lactate Ringer's solution (lactec), recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on renal cortex O<sub>2</sub>-tension (PtO<sub>2</sub>(R)) (A), brain O<sub>2</sub>-saturation (StO<sub>2</sub>(B)) (B) and rectus abdominis O<sub>2</sub>-saturation (StO<sub>2</sub>(M)) (C) in anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (○; lactec group, □; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group)



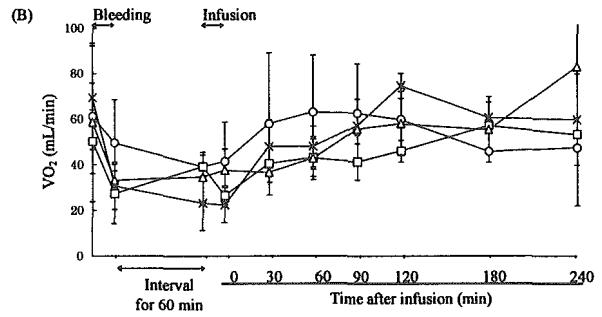
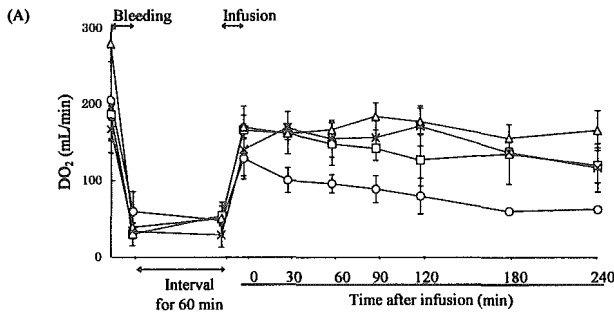
**Fig. d.** Effects of recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on renal cortex O<sub>2</sub>-tension (PtO<sub>2</sub>(R)) (A), brain O<sub>2</sub>-saturation (StO<sub>2</sub>(B)) (B) and rectus abdominis O<sub>2</sub>-saturation (StO<sub>2</sub>(M)) (C) in anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (□; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group)



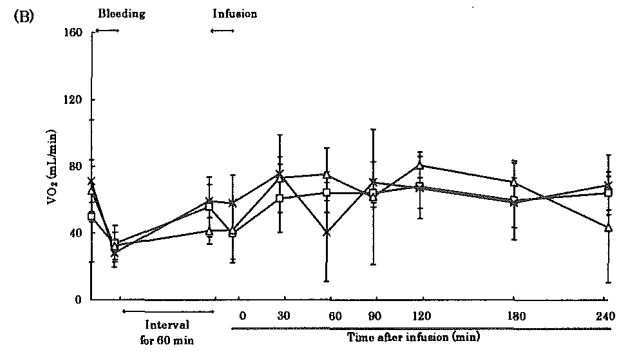
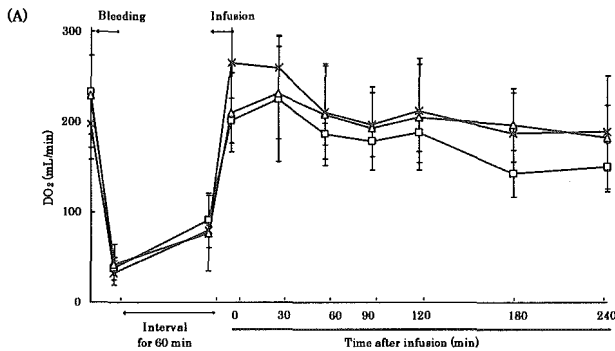
**Fig. 5.** Effects of lactate Ringer's solution (lactec), recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on hemoglobin (Hb) concentration (A), hematocrit (Hct) value (B) and lactic acid (LA) level (C) in whole blood of anesthetized dogs subjected to 50% hemorrhage. (○;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



**Fig. e.** 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/rHSAgroup)



**Fig. 6.** Effects of lactate Ringer's solution (lactec), recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on oxygen delivery ( $DO_2$ ) (A), oxygen consumption ( $VO_2$ ) (B). (○; lactec group, □; rHSA group, ×; shed blood group and △; HbV/rHSA group).



**Fig. f.** Effects of recombinant human serum albumin (rHSA), shed blood and Hb-vesicles (HbV/rHSA) on oxygen delivery ( $DO_2$ ) (A), oxygen consumption ( $VO_2$ ) (B). (□; 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

① (Fig. 5) 脱血ショック蘇生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 7.2 g/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 13.2 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 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。LR 群では改善が軽度で、蘇生 120 分後よりは再び上昇に転じた。

② (Fig. e) ①とほぼ同様の変化を示した。

### 6. 酸素運搬量

① (Fig. 6(A)) 蘇生後の酸素運搬は各群で改善を示し、ASB 群、rHSA 群、HbV 群の間には有意差を認めなかった。LR 群では蘇生後 30 分より他の 3 群(LR 群、HbV 群、ASB 群)に比し有意に低値であった。

② (Fig. f(A)) ①と同様の変化を示した。

### 7. 酸素消費量



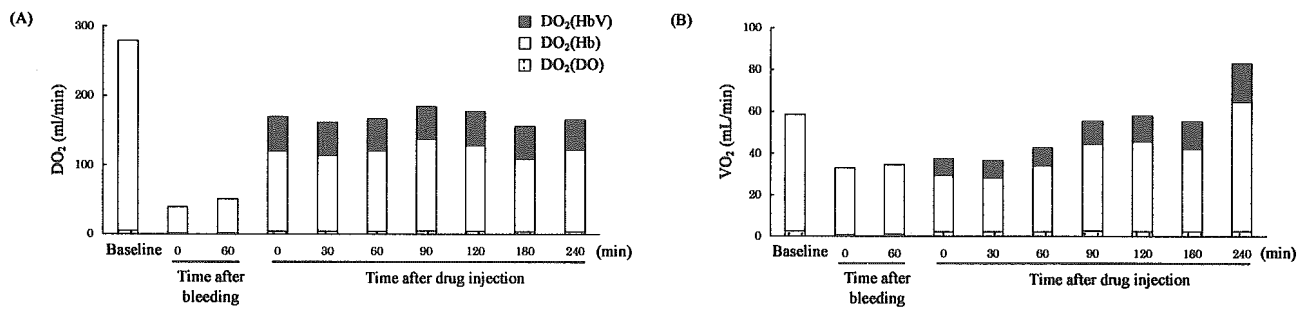


Fig. 7. Rate of HbV derived oxygen delivery ( $DO_2(HbV)$ ), RBC derived oxygen delivery ( $DO_2(Hb)$ ) and dissolved oxygen derived oxygen delivery ( $DO_2(DO)$ ) in total oxygen delivery ( $DO_2$ ) (A) and HbV derived oxygen consumption ( $VO_2(HbV)$ ), RBC derived oxygen consumption ( $VO_2(Hb)$ ) 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 hemoglobin vesicle.

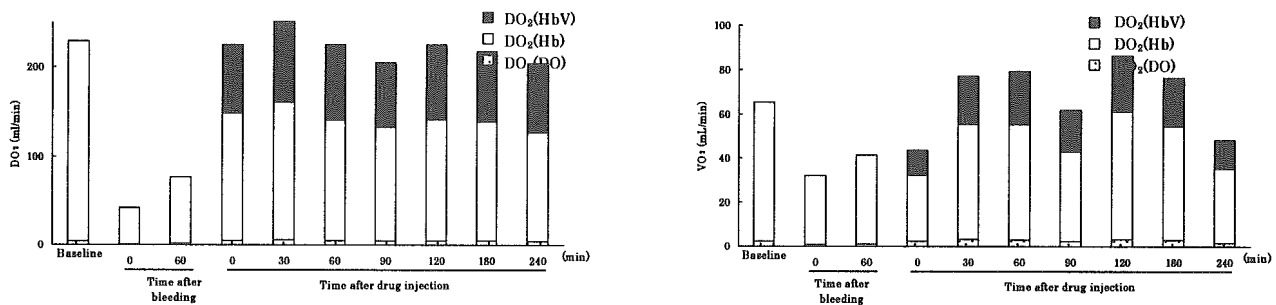


Fig. 8. Rate of HbV derived oxygen delivery ( $DO_2(HbV)$ ), RBC derived oxygen delivery ( $DO_2(Hb)$ ) and dissolved oxygen derived oxygen delivery ( $DO_2(DO)$ ) in total oxygen delivery ( $DO_2$ ) (A) and HbV derived oxygen consumption ( $VO_2(HbV)$ ), Hb derived oxygen consumption ( $VO_2(Hb)$ ) 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.

① (Fig. 6(B)) 酸素消費量は脱血ショック後 40 ml/min 以下に一時的に低下したが、蘇生により回復し、すべての群で有意差を認めなかった。

② (Fig. f(B)) ①と同様の変化を示した。

## 8. Hb 小胞体の酸素運搬、酸素消費の寄与度

① (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 の 64%となった。このうち 24~27%の O<sub>2</sub> 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。1 時間後からは

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。

② (Fig. g) ①と同様の変化を示した。

## D. 結論

出血性ショックモデルに対する HbV の投与試験は、小動物では種々のモデルで検討され、有効性と安全性が確認されているが、中大動物での検討はまだ行われていなかった。中大動物を使用する利点は、経過途中の血液の状態を全身状態に影響を与えずに検査できることと、心肺循環諸標特に肺循環系の指標を Swan-Ganz カテーテルを用いることにより解析できることにある。

今回ビーグル犬を用いて脱血ショックモデルを作成し、HbV の有効性と安全性を検討した。平成

15年度にショックモデルにおいて人工赤血球の有効性を検討するためのモデルを6種類作成し、検討したところ、犬ではショックに伴い脾臓が収縮することによって循環血液量の減少を体内で補正する機序が効率的に働くことが明らかとなったので、平成16年度は脾摘を行い、その後に50%脱血ショックを行うモデルで検討することとした。このモデルは鈍的腹腔内臓器損傷として臨床的に遭遇する外傷の症例によく似た経過を示すと考えられ、本モデルで安全性と有効性が証明されることは臨床応用に近づくために必要であると考えられた。一方、平成17年度はより臨床での使用に近い形を想定し、また代謝臓器としての脾臓の機能を考慮し、蘇生液の安全性の検討のため脾摘を行わないモデルで実験を行った。

50%脱血ショックの状態を蘇生するためにLactate Ringer 溶液(LR群)、ヘパリン加脱血液(ASB群)、リコンビナントアルブミンを生理食塩水に5%濃度で溶解した溶液(rHSA群)、HbVを5%rHSAに分散した溶液(HbV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、出血性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、心負荷と心筋の酸素需要を増大させる。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かとなった。一方、HbV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。しかし、脾摘した場合のHbV群では投与直後

に肺動脈圧が有意に上昇することが明らかとなり、HbVによる効果であると考えられた。この原因として、まず①小粒径のHbVは赤血球に比較して相対的な表面積が大きく、肺血管を拡張させているNO(一酸化窒素)を一時的に吸着するために肺動脈圧が上昇したと考えられる。また、肺動脈圧の上昇が一時的な変化で30分後にはASB群と有意差のない状態に復したことは、肺循環の適応が早く、NOの産生と分布状態が速やかに生理的な状態に回復したものと考えられた。その他、肺動脈圧上昇の原因として文献等から、②動物種(特に反芻動物や犬など)によっては肺の毛細管内にマクロファージが多く存在し、これが異物であるHbVを捕捉して活性化した際に、血管収縮因子(トロンボキサン)を放出したことも考えられた。しかし、病理学的な変化は肺組織では明らかでなく、この一過性の変化は病的なものではない。しかし平成17年度に行った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。肺動脈圧についてもHbV/rHSA群は他の群と同様の変化を示した。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い。

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

## 2. Hb 小胞体が免疫系に及ぼす影響

### A. 研究目的

これまでに、Hb 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。これらを踏まえ、HbV 連続投与が血中補体価に及ぼす影響、HbV 投与によるアナフィラキシー反応が惹起されうる可能性、そして新たな検討項目として、HbV 投与後の脾細胞の免疫応答反応について詳細に検討した。

### B. 研究方法

#### 1. HbV 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 HbV (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 saline を輸注した。3 日後にプレーン採血後、再度 HbV あるいは saline 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×45min、4°C で遠心して HbV 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。

#### 2. 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 HbV と同じ脂質組成で Hb を含まない空リポソーム (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 HbV を尾静脈より輸注した。コントロールとして同量の saline を輸注した。投与後、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、1mg 卵白アルブミン (OVA) を Complete Freund's adjuvant 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。

#### 3. Con A 刺激による脾細胞の応答性の検討

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: RPMI1640/10%FCS/50mM/2mercaptethanol) 5mL 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) 5mL にて 3-5 分間溶血処理をした。溶血処理細胞液に 5ml 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。

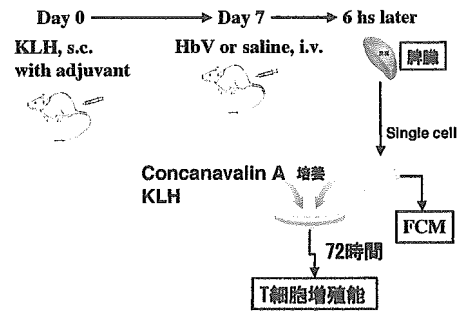
脾細胞中に含まれる単核球の表面抗原を、APC 標識抗 CD3 抗体 (BD)、FITC 標識抗 CD45R 抗体 (BD)、PE 標識抗 MHC class II 抗体 (Immunotech)、FITC 標識抗 CD25 抗体 (BD)、FITC 標識抗 CD11b 抗体 (BD) を用い、フローサイトメーター (LSR、日本ベクトンディッキンソン) にて測定した。脾

細胞  $1 \times 10^5$  個を含む懸濁液に各種抗体を加え、 $4^\circ\text{C}$ 、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 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  $2 \times 10^5$  個/200mL/ウェル、Con A を終濃度 0、0.3、3mg/ml になるように triplicate で分注し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  にて培養した。培養 72 時間後に各ウェルに 18.5 kBq の  $^3\text{H}$ -デオキシチミジン (アマシャム)  $10 \mu\text{L}$  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  $^3\text{H}$ -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  $1 \times 10^6$  個/ml/well で播種し、Con A を終濃度 0、0.3、3mg/ml になるように添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  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、その他のものはアンタイボディオミクス法 (Bio-Plex Cytokine Assay, BioRad) にて測定した。Nitrate Oxide (NO) 濃度は Griess 反応により  $\text{NO}_2$  として測定した (R&D)。上記の測定は、培養時に終濃度 250 mM 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。

#### 4. Keyhole Limpet Hemocyanin に対する脾リンパ球の反応性の検討

Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) によるラット



Scheme 1 Experimental Protocol.

の priming:

50mL の saline あるいは KLH 溶液 (200mg KLH 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 (Scheme 1)。

### C. 実験結果

#### 1. HbV 連続投与による血中補体価の変動

HbV の初回投与後 3 日目に血中補体価が低下していた。しかし、その後 3、6、9、12 日目と投与を重ねたが、血中補体価のさらなる低下傾向は認められず、その値はむしろ投与前 (あるいは saline 投与群) と同じレベルまで回復していった (Fig. 1)。

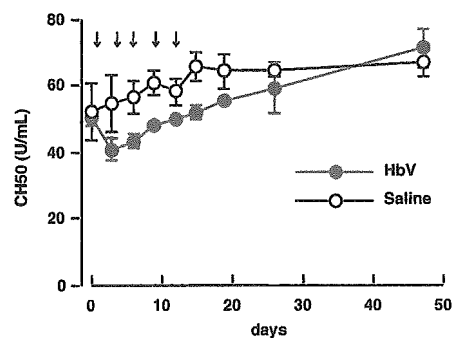


Fig. 1. Changes of complement activity in rat peripheral blood after repeated HbV injection