

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

Table 1 Lack of anaphylactic shock on rat injected with Waseda/Keiou liposome(Empty vesicle)

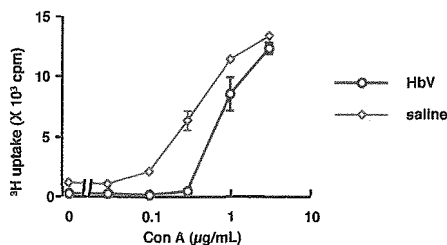


Fig. 2 Con A-stimulated T cell proliferation of rat splenocytes at 6 hrs after HbV injection

2. アナフィラキシー反応の検討

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

3. Con A 刺激に対する脾細胞の応答性の検討

HbV投与6時間後にCon A刺激による脾細胞の非特異的T細胞増殖反応を検討したところ、低濃度Con Aに対する応答性が低下しているが、Con A濃度が高くなると応答性の低下は軽度となる傾向が認められた(Fig. 2)。

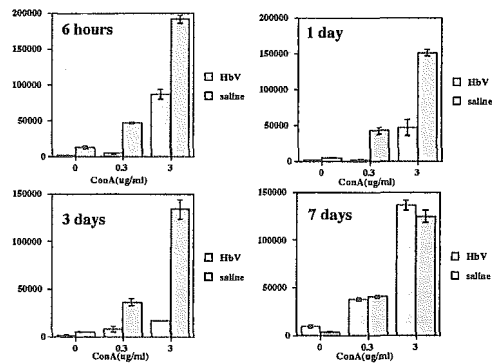


Fig. 3 Inhibition of Con A stimulated proliferation of splenocytes following injection of HbV or saline. N=3, mean±SEM

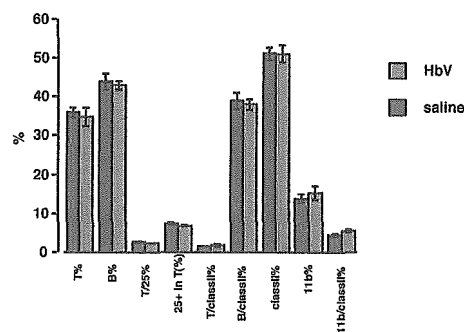


Fig. 4 Flow cytometric analysis of rat splenocytes at 6 hrs after HbV injection

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. 3)。

増殖反応の低下は、脾細胞中に含まれるT細胞の割合に左右される可能性があるため、HbV投与6時間後のリンパ球、マクロファージのサブセットの割合をsaline投与群と比較したが両者の間に明かな差を認めなかった(Fig. 4)。これらの結果から、Con Aに対する反応性の低下は反応に関与する細胞の量的な変動によるものではないと推定された。

Con A刺激によりT細胞が誘導される基本的な機序として、1) T細胞上に高親和性IL2レセプタ

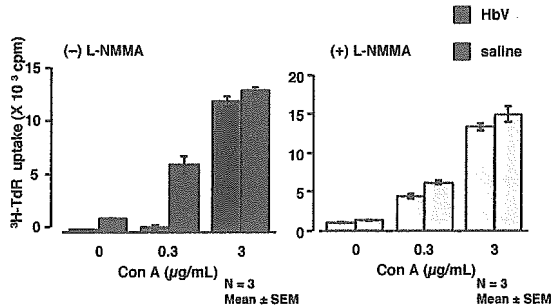


Fig. 5 Con A stimulated proliferation of rat splenocytes in the presence or absence of L-NMMA at 6hours after HbV injection.

一が発現する、2) T 細胞の増殖因子である IL2 が分泌され IL2 レセプターを介して細胞の増殖シグナルが入る、ことが考えられる。一方、T 細胞の反応性を制御するものとして IL2 以外のサイトカインと Nitrate Oxide(NO)が考えられる。また反応途中でT細胞がアポトーシスに陥ることも考えられる。そこで、これらについて HbV 投与群と saline 投与群について比較検討した。

先ず、NO の影響を反応系に L-NMMA を添加することで評価した。その結果、HbV 投与 6 時間後に採取した脾細胞の Con A(0.3mg/ml)刺激による増殖反応の抑制は、L-NMMA の存在下では saline 投与群に近いレベルまで回復することが確認された (Fig. 5)。この時 Con A 刺激下での NO の産生量は、HbV 投与群が saline 投与群より高く、実験に用いた L-NMMA 存在下ではその産生量が抑制されることも確認された (Fig. 6)。

一方、Con A 刺激後 48 時間後の IL2 レセプター α 鎖の発現は、saline 投与群との間に差は無かった(Fig. 7)。また培養上清中に分泌された IL2 の量も saline 投与群との間には差を認めなかった (Fig. 8)。アポトーシス細胞の割合も両群の間に差はなかった (データは示さず)。これらの結果は、HbV 投与された後の T細胞も活性化されて高親和性 IL2 レセプターを発現おり IL2 も存在しているので、増殖するための準備は整っていることを示している。

IL2 以外のサイトカインの産生は、調べた限り

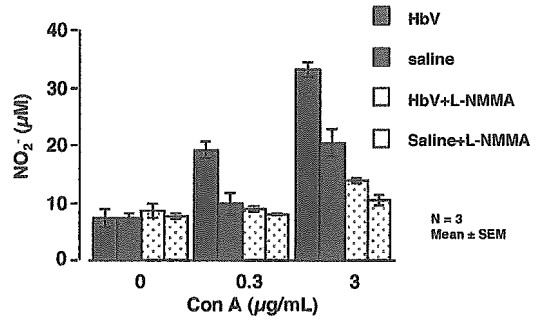


Fig. 6 NO production of rat splenocytes taken at 6hours after HbV injection and cultured for 48 hrs in the presence of Con A with or without L-NMMA

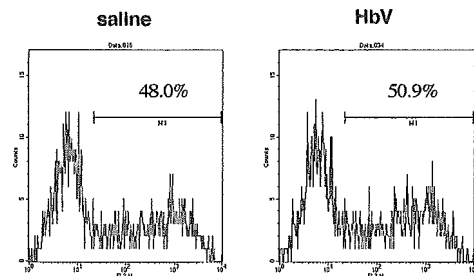


Fig. 7 Intensity of CD25 expression on T cells in rat splenocytes at 48 hrs after Con A (0.3 μg/ml) stimulation

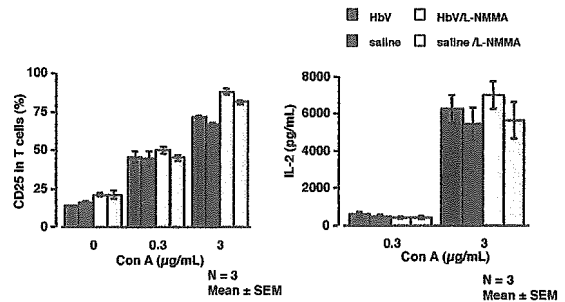


Fig. 8 Expression of CD25 and IL2 secretion by ConA-stimulated rat splenocytes in the presence or absence of L-NMMA.

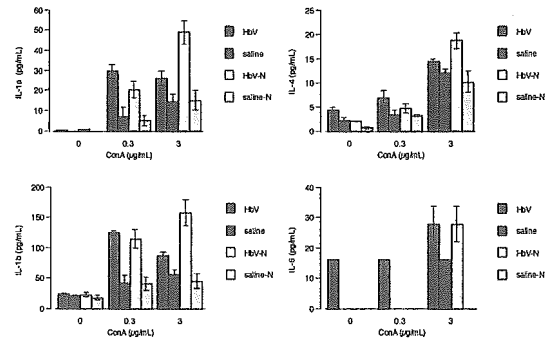


Fig. 9 Cytokine production from ConA stimulated rat splenocytes in the presence or absence of L-NMMA.

では程度の差はあるが TGF-β を除きいずれも Con A(0.3mg/ml)刺激で saline 投与群より HbV 群が高い傾向が認められた。しかし L-NMMA 存在下

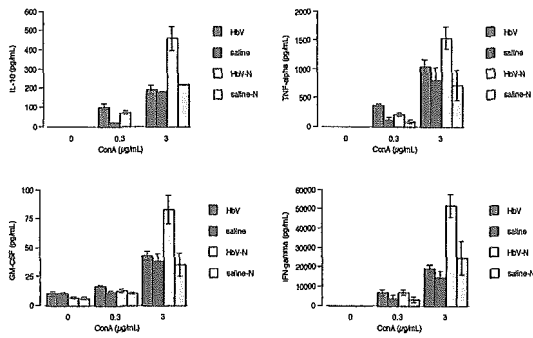


Fig. 10 Cytokine production from ConA stimulated rat splenocytes in the presence or absence of L-NMMA.

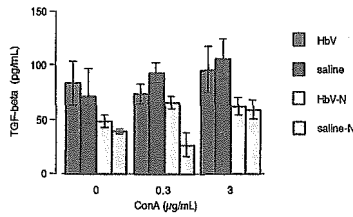


Fig. 11 Cytokine production from ConA stimulated rat splenocytes in the presence or absence of L-NMMA.

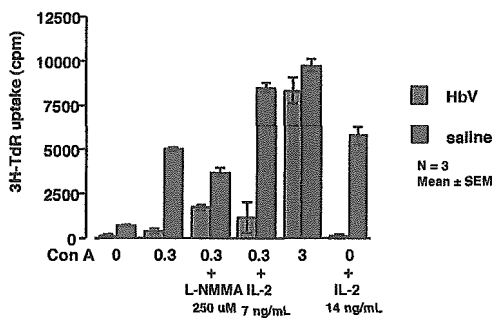


Fig.12 Effects of exogenous IL2 on ConA activated rat splenocyte

でもそれらの産生は変化が無かった。TGF- β は刺激の有無に関わらず産生が認められた (Fig. 9, 10, 11)。

次に、反応系に十量の IL2 を添加することにより T 細胞の増殖の抑制が解除されるか否かを検討した (Fig. 12)。Saline 投与群では IL2 の添加により Con A(3mg/ml)と同じレベルまで増殖が増強したが、HbV 投与群は、IL2 添加による明かな増強効果は認められなかった。同様のことが、Con A 未刺激で高濃度の IL2 のみを加えた場合も認められた (Fig. 13)。従って、T 細胞は活性して IL2 レセプターを発現しているが、IL2 に反応して増殖

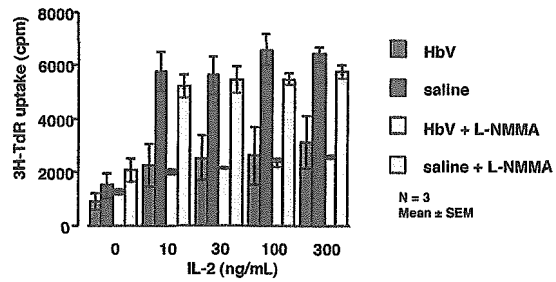


Fig.13 Effects of exogenous IL2 on rat splenocyte

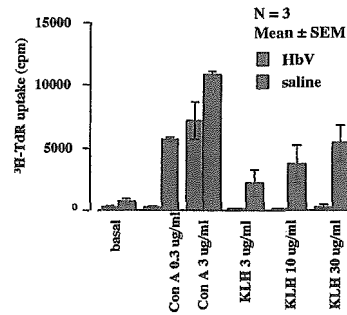


Fig. 14 The effect of HbV injection on secondary response of splenocytes to KLH

できない状態であると考えることができる。

Con A に対する応答性と同じように、蛋白抗原である 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すべての濃度の KLH に対しても認められた (Fig. 14)。

D. 考察

異物としての小胞体 (リポソーム) を生体内に投与するにあたり、懸念されてきた有害事象の一つに血中の補体との相互作用がある。従来、*in vitro* の系では HbV と補体との相互作用は認められなかったが、ラットへの *in vivo* 1 回投与により一過性の補体価の低下を認めていた。今回は HbV を連続投与したが、初期に一過性に補体価が低下したが、投与を重ねるたびに更に低下することはなく、むしろ投与期間中から saline 投与群と同じレベルまで回復していった。この要因は不明であるが、HbV を細網内皮系細胞が大量に貪食することが引き金となっていると推定される。補体価が回復

した理由として細網内皮系細胞内にある HbV を代謝するための酵素の誘導などを経て、HbV 負荷に対応できる状態となった、或は HbV の貪食に抑制がかかり、補体系への影響がストップしたなどが考えられる。連続投与でも、補体系の低下は一過性であったという結果から、HbV 投与は補体系に対して憂慮すべき有害事象を引き起こさないと推定できよう。

HbV の生体内への投与で懸念されるもう一つの有害事象としてアナフィラキシー反応（あるいはショック）がある。空リポソームを一定の間隔をあけて4回投与したが、観察した限り、ラットへの影響は認められなかった。コントロールとして OVA を投与したラットは全例2回目投与終了後に死亡した。このことから、HbV を構成しているリポソームそのものの抗原性は低く、少なくともラットでは連続投与によってもアナフィラキシー反応は発生しないと考えられる。

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

今回の検討から、HbV の投与により、非特異的なマイトージェンである ConA だけではなく、蛋白抗原(KLH)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1週間では、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。

今回の検討から、T細胞の反応性の抑制は、一過性のアナジと類似の反応によるものと考えるのが妥当である。言い換えると Con A 刺激により活性化した T細胞が高親和性の IL2 レセプターを発現し、そこに IL2 が作用することで細胞内増殖シグナルが伝達されるが、この伝達系が一過性に

障害を受けていると考えるのが自然である。その理由として脾細胞のサブセット、刺激後48時間後のアポトーシス細胞の割合、T細胞表面の IL2 レセプター α 鎖の発現、培養上清中の IL2 濃度は saline 投与群との間に差がなかったこと(Fig. 7, 8)、および増殖反応が抑制された T細胞に IL2 を添加しても増幅反応の明らかな回復が無かったことが挙げられる(Fig. 12)。高濃度の IL2 添加にも関わらず、HbV 投与群の脾細胞は殆ど増殖反応を示さなかったこともこのことを支持している(Fig. 13)。今後、IL2 レセプターから下流の細胞内シグナル伝達系の検討が必要と思われる。また、T細胞の増殖を抑制する細胞集団(例えば抑制性 T細胞)などの誘導が起こっている可能性も念頭におく必要がある。

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

培養上清中のサイトカインの中で、増殖抑制に直接関与していると思われるものは、調べた限りでは認められなかった。特に免疫反応の抑制に関与するとされる IL10、TGF- β の動態は、この反応系では抑制に関与していると推定できるものでは無かった。

蛋白抗原である KLH に対する脾リンパ球の二次免疫応答も、ConA 刺激と同様に抑制を受けた。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は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、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 投与により、血中補体価変動、アナフィラキシー反応の誘導については、懸念すべき異常は観察されなかった。HbV の投与後、脾細胞の Con A 刺激に対する免疫応答の一過性の低下が認められた。同じく、蛋白抗原(KLH)に対する二次免疫応答も低下していたが、これも一過性である可能性が高い。その際、T 細胞は一過性のアナジー類似状態になっているものと推定される。アナジー状態を引き起こす原因としては、Con A 刺激に伴って産生される NO の影響が考えられる。今後は、リンパ節の細胞の機能の検討、NO 産生の機序、T 細胞のアナジー状態の分子レベルでの解析を行うことが必要である。

3. Hb 小胞体がヒト造血前駆細胞のコロニー形成に及ぼす影響

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。そこでここでは主として、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、一晚あるいは 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。35 mm 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 cm² 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(4.5×10^7 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ーゼ遺伝子を導入して不死化したヒトストローマ細胞株を用いた。12.5cm² 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)(Bio Whittaker, 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。

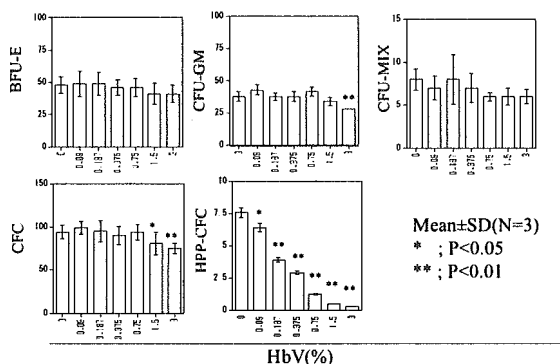


Fig. 1 Effect of HbV on colony formation of MNCs derived from cord blood

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。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する 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行ってみると、一晩の共培養では HPP-CFC の抑制はなかったが 3 日間の共培養後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。

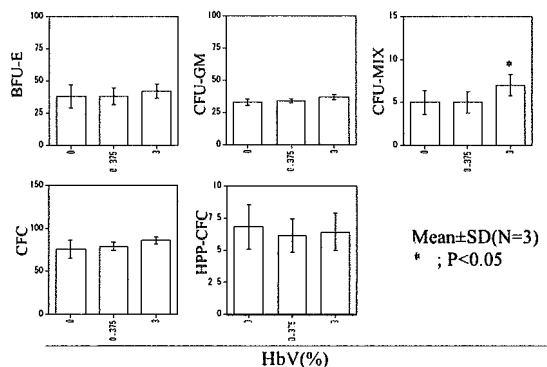


Fig. 2 Effect of HbV on colony formation of MNCs derived from cord blood. MNCs were incubated in liquid medium overnight in the presence or absence of HbV, then colony assay was performed.

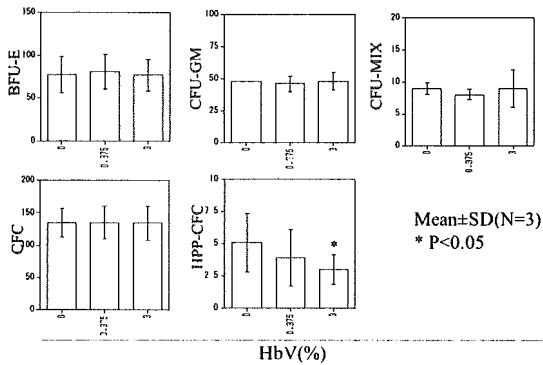


Fig. 3 Effect of HbV on colony formation of MNCs derived from cord blood. MNCs were incubated in liquid medium for 3 days in the presence or absence of HbV, then colony assay was performed.

3. ストローマ細胞との共培養下での Hb 小胞体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、

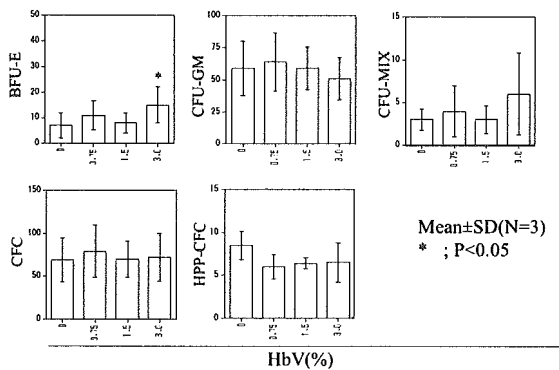


Fig. 5 Effect of HbV on colony formation of CD34+ cells derived from cord blood. CD34+cells were cocultured with stroma cell in liquid medium for 2 weeks in the presence or absence of HbV, before colony assay was performed.

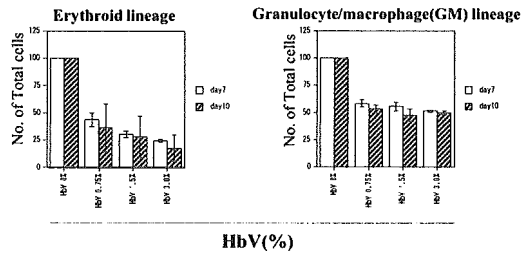


Fig. 4 Effect of HbV on cell proliferation of purified CD34+ cell derived from cord blood. Purified CD34+ cells were cultured in the liquid medium for 7 or 10 days in the presence or absence of HbV. Then, total cell number was counted. For the culture of erythroid and GM lineage cell, IL3+SCF+Epo, IL3+SCF+G-CSF+GM-CSF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

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。しかしながら HPP-CFC の形成では HbV の濃度依存的な抑制が認められた。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ている、しかしながら、更に 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 と一晩あるいは 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。その結果もっとも高い濃度で HPP-CFC の

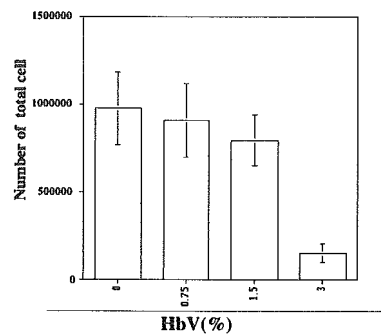


Fig. 6 Effect of HbV on cell proliferation of purified CD34+ cell derived from cord blood. Purified CD34+ cells were cocultured with stroma cell in liquid medium for 14 days in the presence or absence of HbV. Then, total cell number was counted.

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* での作用を類推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 と共培養した後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 が例えば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は、影響を受け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、HbV の細胞障害作用はないものと考えられる。一方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ことから、観察された増幅の抑制は、HbV の *in vivo* における造血機構への影響を必ずしも反映していない可能性が高い。

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。

4. 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。その後に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 saline 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。

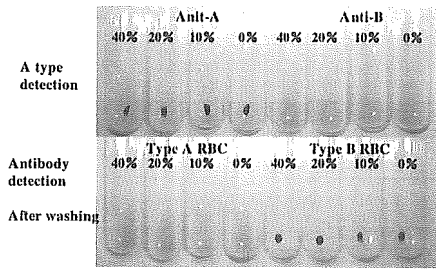


Fig. 1 Detection of type A red blood cells by standard manual test tube method. Type A blood was mixed with HbV(0%-40%) then blood type was determined by anti-A and B monoclonal antibody (Upper). Only anti-B antibody(hemagglutinin) was detected in the plasma(Lower).

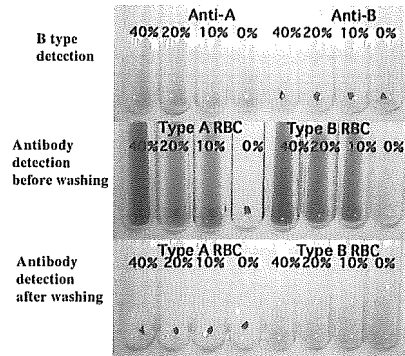


Fig. 2 Detection of type B red blood cells by standard manual test tube method. Type B blood was mixed with HbV(0%-40%) then blood type was determined by anti-A and B monoclonal antibody(Upper). Only anti-A antibody(hemagglutinin) was detected in the plasma(Middle and Lower).

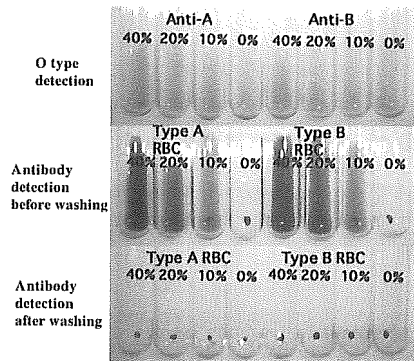


Fig. 3 Detection of type O red blood cells by standard manual test tube method. Type O blood was mixed with HbV(0%-40%) then blood type was determined by anti-A and B monoclonal antibody (Upper). Both anti-A and B antibody(hemagglutinin) was detected in the plasma(Middle and Lower).

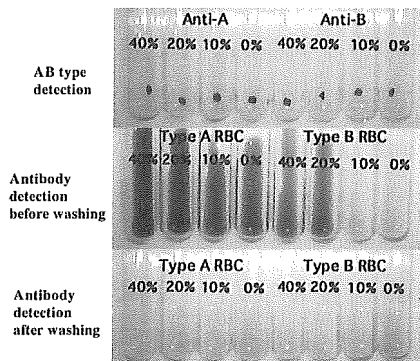


Fig. 4 Detection of type AB red blood cells by standard manual test tube method. Type AB blood was mixed with HbV(0%-40%) then blood type was determined by anti-A and B monoclonal antibody(Upper). Neither anti-A or B antibody(hemagglutinin) was detected in the plasma(Middle and Lower).

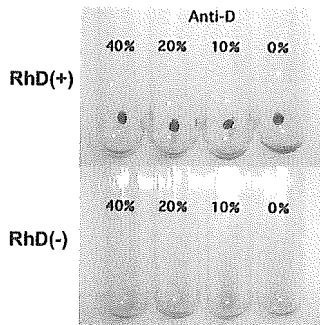


Fig. 5 Rh D(+) or RhD(-) blood was mixed with HbV(0%-40%) then Rh type was determined by anti-D monoclonal antibody.

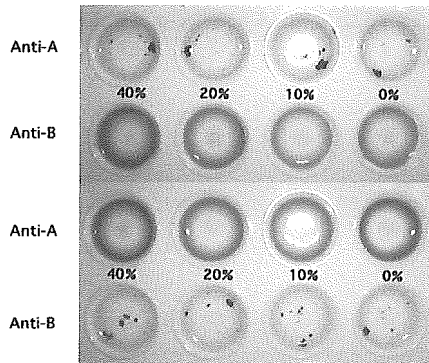


Fig. 6 Type A(Upper) or type B(Lower) was mixed with HbV(0-40%) , then blood type was determined using standard manual glass plate method.

Table 1 Summary of test results

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

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

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。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。

5. Hb小胞体が血球や血液凝固線溶系に与える影響

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、互いに結合し合う為の接着分子や受容体があり、これらを介して細胞の接着が起こる。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。人工血液代替物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。

本研究は血液代替物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検査値、止血能／血栓溶解能や血小板機能への影響を、16年度では *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を検討した。検討の結果、*in vivo*、*in vitro* 研究ともに一部の比色法や比濁法を原理とする検査では異常値が認められたため、17年度では HbV が検査測定系に与える影響を調査するためヒト血清及び血漿に HbV を添加し生化学的検査、血液学的検査を行った。

B. 研究方法

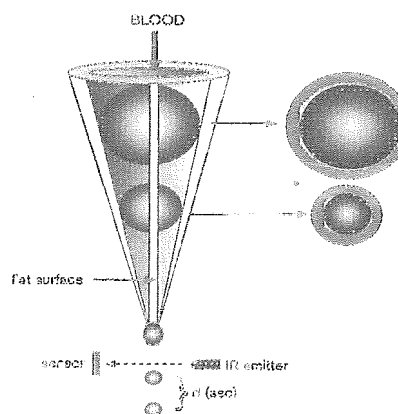
1) 凝固線溶系検査値への影響

ヒト血液(1/9(v/v)3.8%クエン酸ナトリウム入り)に HbV、Hb を内包しない空球小胞体または生理食塩水を添加し、遠心分離 (1000g、10min) して血漿を採取した。それぞれ得た血漿について、特に DIC の診断の際に行われる検査項目の検査値を調べた。APTT、PT、フィブリノゲン、D-ダイマー、TAT、PIC、FM テスト、AT、プロテイン C、プロテイン S、t-PA-PAI 複合体、プロトロンビン F1+2、

プラスミノーゲン、 $\alpha 2$ アンチプラスミン、凝固 X 因子、凝固 XII 因子について測定した。

2) 止血能／血栓溶解能の総括的評価

Goerog Thrombosis Test (GTT、Fig.1) を用いて総括的に止血能／血栓溶解能を評価した。この装置では抗凝固剤なしの全血が 2 つの小さな ball の隙間を通過する際に血小板や凝固因子の活性化が起こり、一定時間後に血栓が形成されるため、血流が閉塞する。閉塞までの時間(occlusion time : OT) を測定する。一方、放置すると線溶能によって一定時間後に血流が再開する(lysis time : LT)。前者は血小板機能や凝固能、ヘマトクリットなどが決定要素であり、後者は総合的な線溶能を反映することが予備検討で明らかにされている。全血に HbV、空球小胞体または生理食塩水を添加した後、両者を測定した。



Practical embodiment of the principle shown in Figure 2.

Fig.1 Goerog Thrombosis Test (GTT)

3) 血小板機能への影響

全血血小板機能検査装置(PFA-100)で評価した。この装置ではコラーゲン／エピネフリン、またはコラーゲン／ADP が固相化されたカセットに全血(1/9(v/v)3.8%クエン酸ナトリウム入り)を通過させる際に形成される血小板血栓により、血流が閉塞するまでの時間(occlusion time)を測定する。血小板機能にほぼ依存しており、凝固系の影響は受けな

い。抗血小板薬服用時や血小板機能異常では延長し、血小板が活性化していると短縮する。全血にHbV、空球小胞体または生理食塩水を添加した後、閉塞時間を測定した。

Table 1 検査項目

<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	バナジウム酸化法
AST	JSCC標準化法
ALT	
LDH	
γGT	
LAP	酵素法
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	選択阻害法(直接法)
HDL-コレステロール	
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
尿素窒素	ウレアーゼUV法
クレアチニン	酵素法
K+	電極法
Ca ²⁺	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

4) 動物投与試験による評価

Wistar系雄性ラット9週齢(体重290~310g)の頸静脈より全血液量の15%相当量を脱血後、同量のHbV、Hbを含有しない空球小胞体または生理食塩水を静脈内投与した。投与1時間後、24時間後頸静脈より3mlを3.8%クエン酸ナトリウム入り真空採血管に採血、遠心分離(3500g、10min)し得られた血漿や血清を用いて血液学的検査値及び凝固学的検査値を測定した。

5) Hb小胞体が臨床検査測定に与える影響

ヒト血液を真空採血管にて採血し、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、空球小胞体、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)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5×10⁴G、25min超遠心分離した後の上清も同様に検査した。

C. 研究結果

1) 凝固線溶系検査値への影響

HbVを全血に対して20%、50%の比率で混合した場合の測定値を生理食塩水や空球小胞体を同率に混合した場合と比較した。(Table 2)その結果、APTT、PT、フィブリノゲン、D-ダイマー、TAT、PIC、FMテスト、プロテインC、プロテインS、t-PA-PAI複合体、プロトロンビンF1+2には全く影響しないことが明らかとなった。しかし、AT、プラスミノゲン、α₂アンチプラスミンはHbVの混合により、その値が上昇した。さらに凝固X因子、凝固XII因子ではHbVの混合(20%、50%いずれも)により、測定が不能となった。これらより、HbVは通常の凝固検査への影響は少ないが、プラスミノゲン、α₂アンチプラスミン、凝固X因子、凝固XII因子など、一部の発色基質を用いた検査に影響することが判明した。また比濁法を用いた方法(ATIII)では異常高値となる可能性が示唆された。

2) 止血能/血栓溶解能の総括的評価

GTTを用いたこの検討では、HbVを全血に対して20%、50%の比率で混合した場合(Table 3)、データにばらつきはみられるものの、occlusion time、lysis timeともに大きな影響は認められなかった。

3) 血小板機能への影響

PFA-100 を用いた *in vitro* 血小板機能の検討 (Table 4) では全血の希釈により occlusion time は延長したが、HbV そのものの occlusion time への影響は明らかではなかった。20%、50%いずれの場合

も通常血球計測装置(CBC counter)での Hb 値を著増させた。

Table 2 凝固線溶系への影響

検査項目	単位	正常値	無添加	20%添加			50%添加		
				生食	vesicle	HbV	生食	vesicle	HbV
APTT	秒	23.5-42.5	29.1	31.7	30.8	31.7	58.5	59.2	59.5
PT活性	%	70-100	100	98	98	67	53	40	39
フィブリノゲン	mg/dl	155-415	230	162	183	170	90	100	100
D-ダイマー	µg/ml	0.72以下	0.50未満	0.50未満	0.50未満	0.50未満	0.50未満	0.50未満	0.50未満
TAT	ng/ml	3.2以下	1.1	0.6	0.8	0.8	0.5	0.5	0.6
FIC	µg/ml	0.8未満	0.6	0.5	0.5	0.5	0.3	0.3	0.2
FMテスト定量	µg/ml	6.1以下	6.1未満	6.1未満	6.1未満	6.1未満	6.1未満	6.1未満	15.6
AT定量	mg/dl	15.0-31.0	28	19.2	49.6	60.0以上	10.9	60.0以上	60.0以上
プロテインC活性	%	73-142	110	77	84	75	47	52	60
プロテインS活性	%	60-127	102	75	69	78	41	38	41
t-PA-PAI	ng/ml	11.7以下	9.3	6.2	6.5	6.9	3.9	3.8	3.6
プロトロンビンF1+2	nmol/l	0.44-1.20	0.81	0.7	0.75	0.72	0.58	0.56	0.52
プラスミノーゲン活性	%	71-128	88	69	73	103	42	38	54
α2アンチプラスミン	%	85-118	88	55	51	105	13	13	25
第10因子活性	%	71-128	119	88	86	※	55	65	※
第12因子活性	%	46-156	146	103	102	※	51	67	※

※測定不能

Table 3 止血と血栓溶解能に与える影響

	OT(sec)	LT(sec)
無添加	300.1	2555
生食	356.8	2446
20%添加 vesicle	319.8	1896
HbV	147.5	2607
生食	352.0	3170
50%添加 vesicle	279.4	1595
HbV	300.8	2206

OT:occlusion time

LT:lysis time

Table 4 血栓形成能に与える影響

(PFA-100 測定結果)

	OT(sec)	WBC(/µl)	Hb(g/dl)
無添加	94	3700	12.6
生食	129	2700	10.4
20%添加 vesicle	119	3100	10.8
HbV	137	—	16.6
生食	269	1800	6.4
50%添加 vesicle	>300	2200	7.5
HbV	>300	—	22.7

OT:occlusion time

5) 動物投与試験による評価

(1) ラットでの凝固学的検査の可否の検討:

ラット血漿においてヒトと同じ試薬で測定可能な凝固系マーカーはAPTT、PT、AT、TAT、フィブリノゲン、FDPであった(Table 5)。VWFも測定値は示したが、少なくともヒトの検査試薬では低値を示すことが判明した。

(2) ラットへの HbV 投与が血液学的、凝固学的検査に与える影響:

血球系では Hb 濃度を除き HbV による影響は見られなかった(Fig. 2-6)。凝固系では APTT、PT、AT には影響はみられず、フィブリノゲンでは投与 24 時間後に TAT、FDP の上昇は見られなかった(Table 6)。若干の増加が見られた(Fig. 7-10)。しかし、これは生理食塩水投与時でも観察され、脱血による影響と考えられた。VWF 活性、抗原については空球小胞体、HbV ともに投与 1 時間後に低下傾向が見られた(Fig. 11,12)。

Table 5 ラットでの凝固学的検査の可否の検討

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

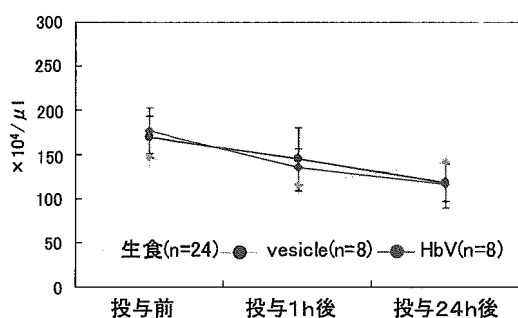


Fig. 2 WBC

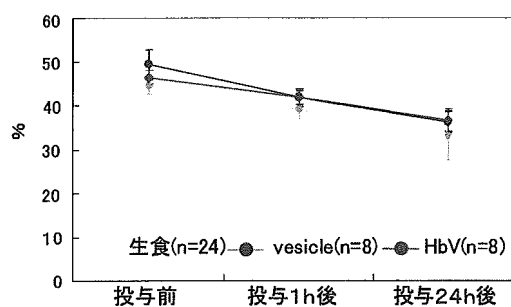


Fig. 4 HCT

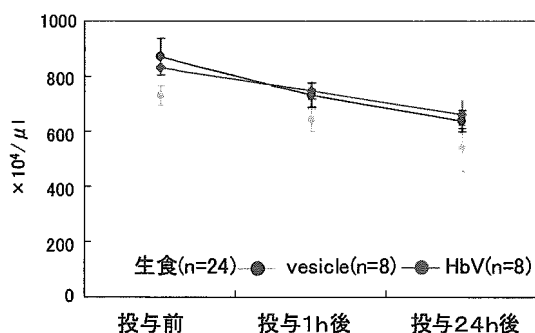


Fig. 3 RBC

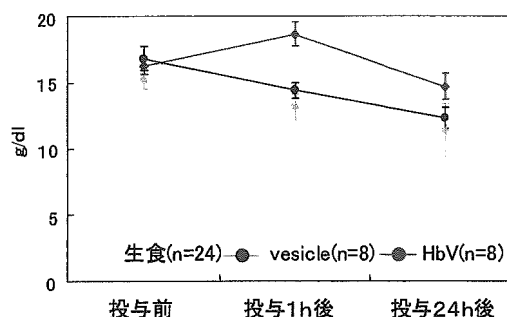


Fig. 5 HGB

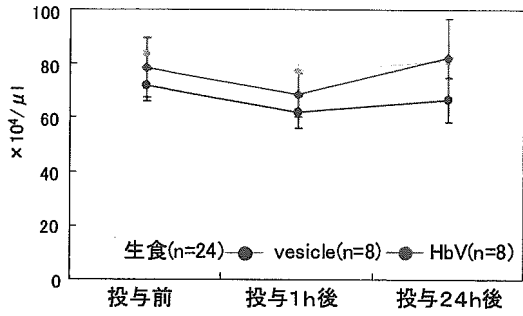


Fig. 6 PLT

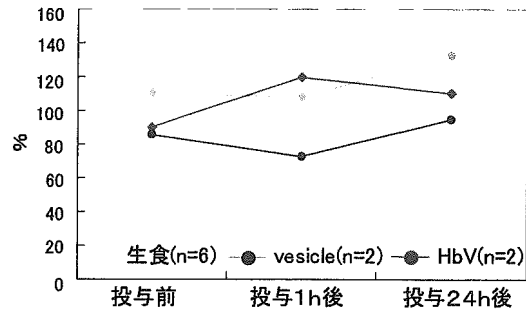


Fig. 10 AT

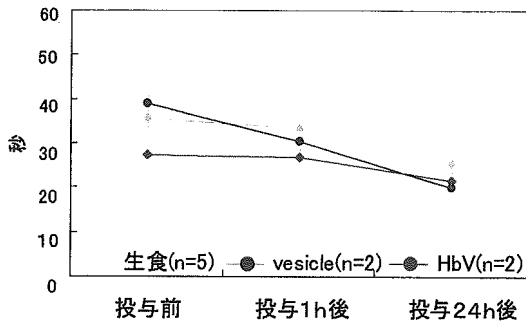


Fig. 7 APTT

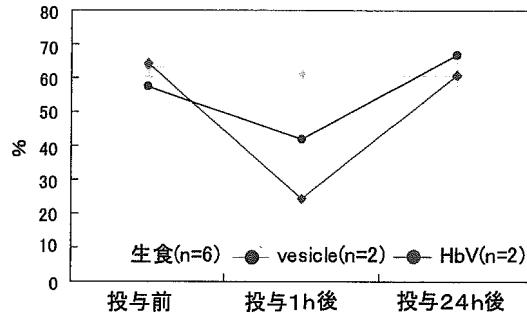


Fig. 11 VWF Ag

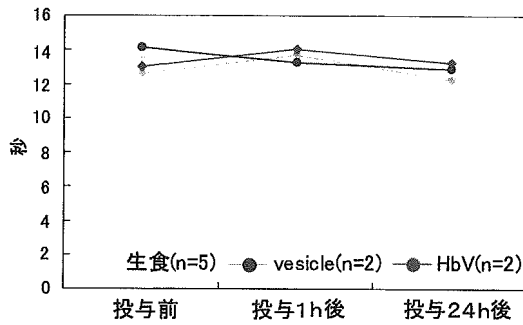
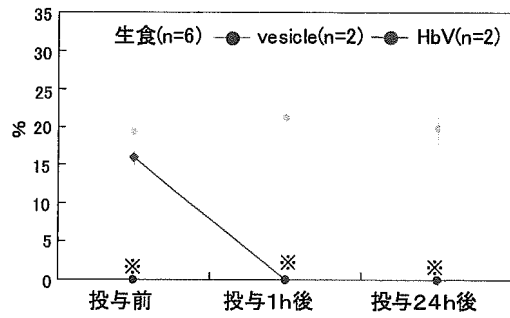


Fig. 8 PT



※ 6%以下

Fig. 12 VWF 活性

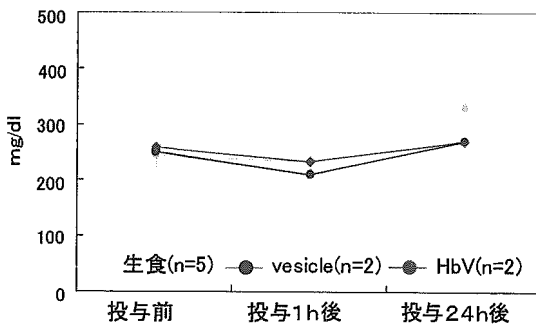


Fig. 9 フィブリノゲン

Table 6 TAT の変化

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

FDP:各サンプル投与ラットすべてにおいて $2.5 \mu\text{g/ml}$ 以下

6) Hb 小胞体が検査測定系に与える影響

生化学的検査(Table 7,9)において、HbV を添加した場合は、総ビリルビン、ALT、 γ GT 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。凝固学的検査(Table 8,10)では 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。

次に HbV が混在する検体のフィルター処理の効果を検討した(Table 7,8)。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、空球小胞体添加時で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。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。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。

超遠心分画処理の効果について検討した結果(Table 9,10)、生化学的検査では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、超遠心分画処理後に生理食塩水添加時と同様の値になっていた。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、空球小胞体添加時で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。

D. 考察

1) 凝固線溶系検査値への影響

HbV は通常の凝固検査への影響は少ないが、plasminogen、 α 2-antiplasmin、凝固 X 因子、凝固 XII 因子など、一部の発色基質を用いた検査に影響することが判明した。また比濁法を用いた方法(AT)では異常高値となる可能性が示唆された。これらは HbV が使用される検査であり、検査値の解釈に重要な知見を与えるとともにサンプリング法や測定法の改良の必要性を示唆する。

2) 止血能/血栓溶解能の総括的評価

HbV は総括的にみて凝固や線溶能に大きな影響を与えないようである。ただし、この結果は *in vitro* での系、すなわち HbV が直接これらに与える影響のみを観察しており、生体内に投与された際に起こる他の生体反応による凝固系への影響を無視している。この点に関しては後述のように動物投与試験で検討した。

3) 血小板機能への影響

HbV は血小板機能に大きな影響を与えなかった。但し、同様に今回の結果は *in vitro* での系、即ち HbV が直接血小板に与える影響のみを観察している。

Table 7 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 フィルター処理	vesicle添加	vesicle添加 フィルター処理	HbV添加	HbV添加 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 8 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 フィルター処理	vesicle添加	vesicle添加 フィルター処理	HbV添加	HbV添加 フィルター処理
APTT	秒	34.2	34.8	37.1↑	34.7	48.1↑	測定不能	200以上
PT	秒	11.0	11.4	11.8↑	11.6	19.0↑		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 9 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 超遠心処理	vesicle添加	vesicle添加 超遠心処理	HbV添加	HbV添加 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 ⁺	mEq/l	4.3	3.6	3.7	3.6	3.7	3.7	3.9
Ca ²⁺	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 10 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 超遠心処理	vesicle添加	vesicle添加 超遠心処理	HbV添加	HbV添加 超遠心処理
APTT	秒	34.3	32.2	33.5	31.9	31.8		33.3
PT	秒	11.2	11.4	11.5	11.4	11.3	測定不能	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

4) 動物投与試験による評価

白血球数、赤血球数はHbV投与1時間、24時間後で減少傾向が見られたがこれは採血時の脱血による影響であり、HbV投与による影響は殆どない

と考えられる。また、Hb濃度についてはHbV投与時では投与1時間後に2g/dlほどの上昇傾向が見られたが、この値は測定装置(Sysmex KX-4500)による赤血球数、ヘマトクリット値測定方法の検討より、

の測定上の問題であると考えられる (HbV が完全に溶解しないことが要因)。血小板数に関しては投与後の経時的変化は見られなかった。

APTT、PT、AT、TAT、FDP では HbV 投与による影響は見られなかった。フィブリノゲンは投与 24 時間後に若干の増加が見られたが、これは生理食塩水の投与でも観察され、脱血による影響と考える。VWF 活性、抗原については空球小胞体、HbV 投与 1 時間後に低下傾向が見られた。血漿中に浮遊している空球小胞体、HbV が測定上に影響を及ぼす可能性が考えられた。

5) Hb 小胞体が臨床検査測定系に与える影響

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、 γ 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 の光吸収、また、HbV と空球小胞体の濁度が検査過程である吸光度測定の影響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。この場合は測定の際に出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、今回

の遠心条件では小胞体が十分除去できていないことが示唆された。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。

凝固学的検査への影響について、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で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、フィブリノゲン、VWF がフィルターを通過する際に減少する、すなわちフィルター上にトラップされることが推測できる。以上のことから凝固検査においては超遠心分画処理が望ましいと考える。

E. 結論

本研究は、HbV が血球や血液凝固線溶系に及ぼす影響を調査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* 研究を行った。その結果、HbV は生体内の血球や血液凝固線溶系に影響を与えないことが明らかとなった。但し、HbV は一部の検査測定系に対し影響を及ぼすため、実際の臨床の場合においては HbV 投与後の血液検体から 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. 放射化標識による Hb 小胞体の体内動態評価

A. 研究目的

投与 Hb 小胞体(HbV)の血中動態と体内分布は、酸素輸液としての安全性と有効性についての基本的な重要性をもつ評価項目として位置づけられる。本研究ではこの測定方法の確立と臨床適応への見込みを目的とし、同位体標識した HbV の体内動態を非侵襲下で観測、安全、代謝に関して定量的評価を試みた。本研究は Prof. Phillips (U. Texas Health Science Center at San Antonio)と早稲田大学 理総研の共同研究で実施されている。

B. 研究方法

同位元素 sodium [technetium-99m] pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4$; 半減期 6 hr) の生理食塩水溶液を hexamethylpropyleneamine oxime (HMPAO)の凍結乾燥体の市販キットに添加した後、この溶液を HbV あるいは小胞体 (EV) 分散液と混合した。1 時間放置後、未内包の $^{99m}\text{TcO}_4$ をゲル濾過にて除去して標識を完了した。本標識 HbV 分散液を試料として動物投与に供した(**Table 1**)。

Table 1 Characteristics of ^{99m}Tc -HbV and ^{99m}Tc -EV suspensions.

Parameters	^{99m}Tc -HbV	^{99m}Tc -EV
[Hb] ^{a)} (g/dL)	9.5	0
[lipids] (g/dL)	4.75	4.75
particle diameter (nm)	247±44	259±32
endotoxin level (EU/mL)	< 0.2	< 0.2

a) MetHb: < 1%, carbonylHb < 2%

動物実験は National Institutes of Health Animal Use and Care guidelines の下、University of Texas, Health Science Center at San Antonio Institutional, Animal Care Committee による承認プロトコールに従い実施した。雄性 Sprague-Dawley ラット(体重 200-274 g)に対し、3% isoflurane 自発呼吸麻酔下、尾静脈に挿入した留置針を介し、全血液量に対し

25vol%の試料を投与した(投与量: 14 mL/kg、投与速度: 1mL/min)。また、雄性 New Zealand White rabbits (体重 2.2-2.9 kg)に対し、ketamine/xylazine 混合液 (50 and 10 mg/kg)大腿部筋注麻酔下、後耳介静脈に挿入した留置針を介し、全血液量に対し 25vol%の試料を投与した(投与量: 14.25 mL/kg、投与速度: 1mL/min)。両者とも経時的に血液を採取し、48 時間後の血液サンプル採取後にマルチシンチレーションカウンターで各試料中の放射線量を計測。HbV の血中残存率は投与直後を 100%として各時間での放射線量から算出した。体内分布計測は HbV 投与ラット、あるいはラビットをγカメラ (PICKER DYNA CAMERA) で撮影した。画像はソフトウェア (Nuclear Imaging System ver. 2.34 R4) に取込んで解析し、肝臓、脾臓への分布経時変化を解析した。投与 48 時間後に犠牲死させ、全身の臓器を採取し各臓器の放射線強度をγカウンター (MINAXI-X Auto-GammaR 5000 Series Gamma Counter; Packard) で計測した。各臓器への HbV の分布率を定量した。

C. 結果および考察

血中投与された HbV は初期の比較的速い過程(α相)と続く緩やかな過程(β相)により血中から消失した(**Fig. 1**)。HbV の半減期はラットで 34.8 h、ラビットで 62.2 h であった(**Table 2**)。Hb を内包していない小胞体 (EV) との比較では、Hb の内包により半減期の延長を認めたが、これは Hb の負荷分による網内系への取り込み抑制によると考えられた。

γカメラによる全身分布の観測では、投与後 12 時間まで HbV および小胞体共に肝臓および脾臓への分布率は経時的に上昇した(**Fig. 2, 3, 4**)。その後、上昇は緩慢になるが、これは大量投与により細網内皮系の飽和に近づいた結果と考えられた。投与 48 時間後の体内分布を **Table 3** に示す。HbV は主に肝臓、脾臓および骨髄に分布し、Hb 内包による分布形態の変化は認めない。これらの臓器には細