

網内皮系に關与する食細胞が多く分布しており、HbV は赤血球と同様の経路にて代謝されると考えられる。

腸、腎臓、糞便、尿での比較的高い放射線の分布は、HbV の代謝、排泄の進行によると考えられた。Table 3 において、肝臓、脾臓および骨髓に分布した HbV を総計 (%ID<sub>total</sub>) するとラットで 26.60%ID、ラビットで 13.64%ID、また小胞体ではラットで 36.36%ID、ラビットで 17.84%ID と算出される。Table 2 に示した対応する  $\beta$  相半減期 ( $t_{1/2\beta}$ ) は、それぞれ 39.1、79.2、30.1、60.2 時間であり、%ID<sub>total</sub> の逆数との比例関係を認めた。この解析は、血中半減期が短いほど、臓器分布率が高くなることを意味しており、HbV が血中から代謝臓器へ移行して消失する過程を定量的に示している。この相関関係により %ID<sub>total</sub> から  $t_{1/2\beta}$  を換算できる可能性を見出した。

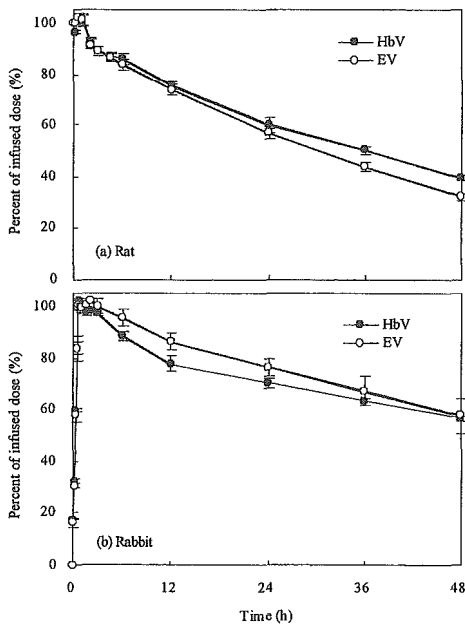


Fig. 1. Circulation kinetics of HbV and EV after top-loading intravenous infusion (14 mL/kg) in rats and rabbits. The radioactivity was determined by scintillation counting of blood samples with time. The percentage of radioactivity is calculated as a percentage of baseline radioactivity in a blood sample withdrawn just after HbV or EV infusion.

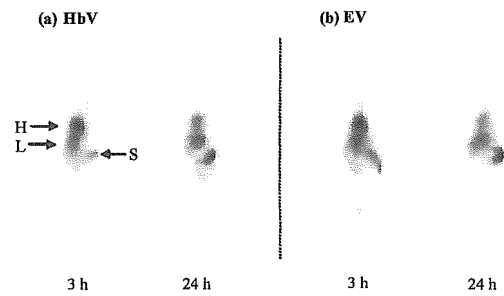


Fig. 2. Static gamma camera images of whole body of rats infused with HbV or EV acquired at 3 h, and 24 h after infusion. The images were acquired for 1 min at 3 h, and 2 min at 24 h. The arrows show heart (H), liver (L), and spleen (S).

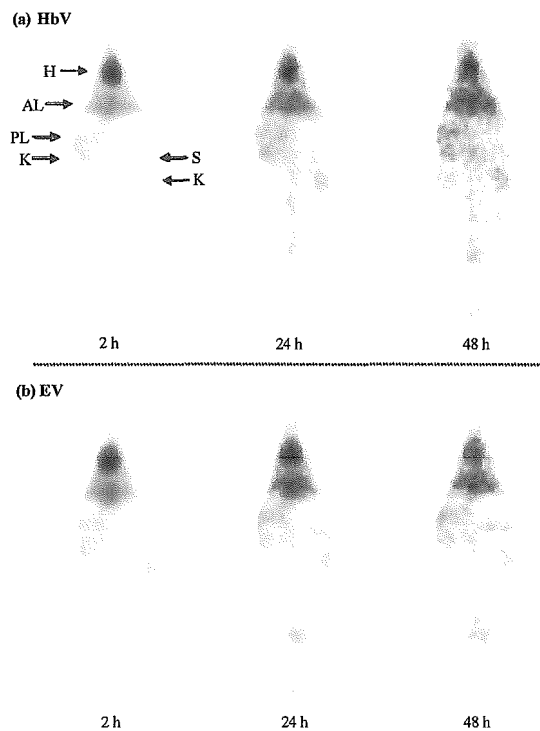


Fig. 3. Static gamma camera images of rabbits acquired at 2 h, 24 h, and 48 h after HbV or EV infusion. The images were acquired for 1 min at 2 h, 2 min at 24 h, and 5 min at 48 h. The arrows indicate heart (H), anterior liver (AL), posterior liver (PL), spleen (S), and kidney (K).

Table 3 において、臓器分布率でラットとラビットを比較すると、大部分の臓器で有意差を認める。特にラビットではラットに比較して脾臓への取り込みが著しく低い。一方、Table 4 に示す様に、臓器重量当りの取り込み量による解析では両種で相違を認めず、同様に肝臓、骨髓においても両種で相違を認めない。臓器分布率での種間有意差が体重に対する臓器重量の相違に因ることを示してお

り、臓器に取込まれた HbV の密度では種差は小さいことが明らかになった。両種共に脾臓が著しく高い密度で HbV を取込んでいる。この解析により、臓器重量当りの取り込み量を指標としてヒトへの推測の可能性が示された。

ヒトの標準臓器重量（参考：International Commission on Radiation Protection, 1984, Report on the task group on reference man. ICRP No. 23, Pergamon Press, New York）を用いて、本実験と同じ投与量（血液量の 25%）の投与の場合の  $\beta$  相半減期 ( $t_{1/2\beta}$ ) は 66 時間と概算された。この数値はラ

ビットに近く、 $\alpha$  相を含めた血中半減期は 2~3 日程度と見積もられた。

#### D. 結論

HbV はヒトに全血液量の 25vol% で負荷投与された場合、半減期（2~3 日）程度で血中を循環すると見積もられる。これは緊急時の措置としては十分な循環時間であると判断できる。血中からの消失は主に肝臓および脾臓の網内系捕捉によることが確認され、赤血球と同様の HbV の代謝経路は安全性に適していると考えられる。

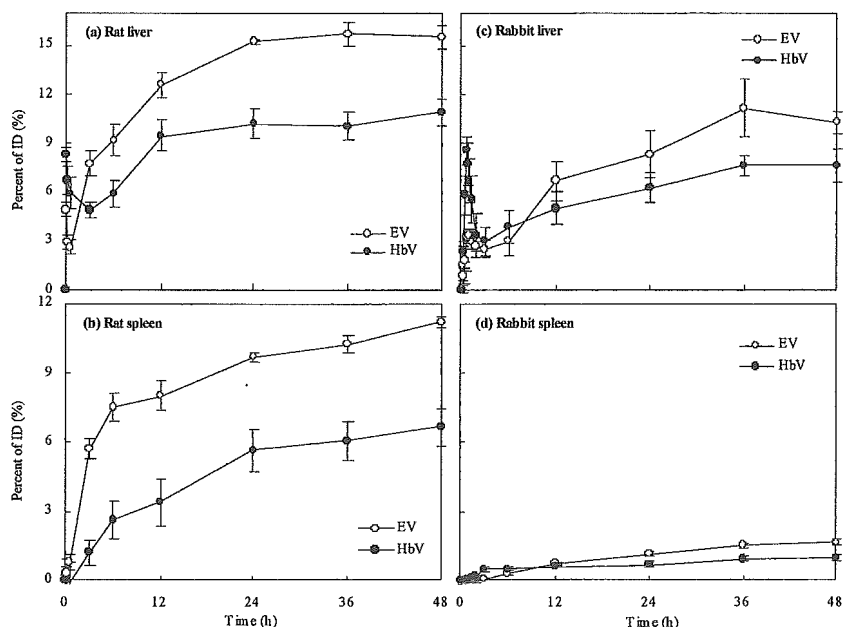


Fig. 4. The percentage of infused dose (%ID) for liver and spleen calculated from the gamma camera image acquired at particular times and after decay correction. The blood pool contribution was corrected using values of 17 and 6 % of the total blood volume for liver and spleen in rats respectively, and 25.4% and %ID just after infusion for liver and spleen in rabbits, respectively.

Animal	sample	distribution ( $\alpha$ ) phase		elimination ( $\beta$ ) phase		$t_{1/2}$ (h)
		$k_a$ ( $h^{-1}$ )	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$k_\beta$ ( $h^{-1}$ )	$t_{1/2\beta}$ (h)	
Rat	HbV	0.0894	7.8	0.0177	39.1	34.8
	EV	0.1004	6.9	0.0230	30.1	29.3
Rabbit	HbV	0.0226	30.7	0.0088	79.2	62.6
	EV	0.0159	43.6	0.0115	60.2	57.3

**Table 3.** Biodistribution of HbV and EV as a percent of the infused dose per organ (%ID/organ) and percent of the infused dose per gram of organ (%ID/ g organ) at 48 h after 25% top-loading in rats or rabbits.

Organ	Rat		Rabbit	
	HbV	EV	HbV	EV
	%ID/organ ± s.e.m.			
Blood	33.27 ± 1.11*	24.13 ± 0.65	50.95 ± 2.02†	52.76 ± 4.80‡
Liver	10.04 ± 0.86*	14.13 ± 0.40	7.55 ± 0.46†	8.64 ± 0.34‡
Bone	10.06 ± 0.21*	13.05 ± 0.38	5.37 ± 0.33*†	7.36 ± 0.28‡
Spleen	6.50 ± 0.30*	9.18 ± 0.37	0.72 ± 0.10*†	1.84 ± 0.28‡
Bowels	7.30 ± 1.59	4.16 ± 0.35	9.61 ± 2.31	8.62 ± 4.42
Skin	2.37 ± 0.33	2.29 ± 0.12	0.88 ± 0.05†	1.09 ± 0.21‡
Kidney	2.40 ± 0.10*	3.35 ± 0.08	1.47 ± 0.13†	1.69 ± 0.21‡
Muscle	1.94 ± 0.28	1.98 ± 0.27	2.51 ± 0.31	2.62 ± 0.76
Lung	0.62 ± 0.03	0.54 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.43 ± 0.06
Heart	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.12 ± 0.01†	0.13 ± 0.02
Brain	0.16 ± 0.01*	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01*†	0.05 ± 0.00‡
Testis	0.12 ± 0.01*	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.02†	0.07 ± 0.01
Feces	9.50 ± 1.17	6.95 ± 0.29	5.06 ± 2.56	2.02 ± 0.55‡
Urine	13.61 ± 0.31	12.87 ± 0.41	11.30 ± 1.22	7.81 ± 1.44‡
	%ID/ g organ ± s.e.m.			
Blood	2.919 ± 0.032	1.706 ± 0.044	0.356 ± 0.017	0.354 ± 0.030
Liver	1.244 ± 0.096	1.378 ± 0.045	0.093 ± 0.004	0.131 ± 0.019
Bone	0.497 ± 0.021	0.518 ± 0.020	0.043 ± 0.003	0.062 ± 0.002
Spleen	10.059 ± 0.072	10.790 ± 0.402	0.823 ± 0.072	1.483 ± 0.072
Bowels	0.390 ± 0.073	0.202 ± 0.008	0.031 ± 0.006	0.029 ± 0.014
Skin	0.091 ± 0.014	0.070 ± 0.004	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.001
Kidney	1.604 ± 0.057	1.839 ± 0.055	0.089 ± 0.005	0.110 ± 0.017
Muscle	0.024 ± 0.003	0.020 ± 0.003	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.001
Lung	0.619 ± 0.022	0.458 ± 0.014	0.068 ± 0.004	0.057 ± 0.012
Heart	0.264 ± 0.009	0.187 ± 0.012	0.026 ± 0.002	0.027 ± 0.006
Brain	0.111 ± 0.010	0.062 ± 0.003	0.011 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Testis	0.042 ± 0.002	0.027 ± 0.001	0.013 ± 0.002	0.016 ± 0.003

\* Difference is statistically significant from EV in same species at  $p < 0.01$

† Difference is statistically significant from HbV in rat at  $p < 0.05$

‡ Difference is statistically significant from EV in rat at  $p < 0.05$

**Table 4** Comparison of HbV and EV as mg lipids/g organ and mg Hb/g organ at 48 h after 25% top-loading in rats or rabbits.

Organ	HbV in rat		HbV in rabbit		EV in rat	EV in rabbit
	mg lipids/g organ <sup>a)</sup>	mg Hb/g organ <sup>b)</sup>	mg lipids/g organ <sup>a)</sup>	mg Hb/g organ <sup>b)</sup>	mg lipids/g organ <sup>a)</sup>	mg lipids/g organ <sup>a)</sup>
Blood	4.23 ± 0.20	8.40 ± 0.40	6.47 ± 0.24†	12.93 ± 0.48†	2.94 ± 0.06	6.55 ± 0.64†
Liver	1.79 ± 0.12	3.56 ± 0.23	1.68 ± 0.06	3.36 ± 0.12	2.38 ± 0.06	2.24 ± 0.18
Bone	0.72 ± 0.01	1.42 ± 0.02	0.78 ± 0.05	1.57 ± 0.09	0.89 ± 0.04	1.09 ± 0.08
Spleen	14.43 ± 0.54	28.63 ± 1.06	14.92 ± 1.25	29.85 ± 2.50	18.58 ± 0.51	25.83 ± 1.43†

† Difference is statistically significant from HbV in rat at  $p < 0.05$

a) calculated values from ID of lipids and % ID /g organ

b) calculated values from ID of Hb and % ID /g organ

## 7. Hb 小胞体の体内動態特性と構成成分の代謝過程の解析

### 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の人工酸素運搬体である。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。更に、HbVの体内動態に関して、<sup>99m</sup>Tc標識したhexamethyl-propylenamine 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及びそ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を用いて、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. <sup>125</sup>I-HbV及び<sup>3</sup>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、<sup>125</sup>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、血液中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。

<sup>3</sup>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、血漿中に含まれる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<sup>3</sup>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<sup>125</sup>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(細胞; $5 \times 10^5$  cells/well), HbV取り込み、分解実験を常法により行った。

### C. 研究結果

#### 1. Hb及びHbVの体内動態解析

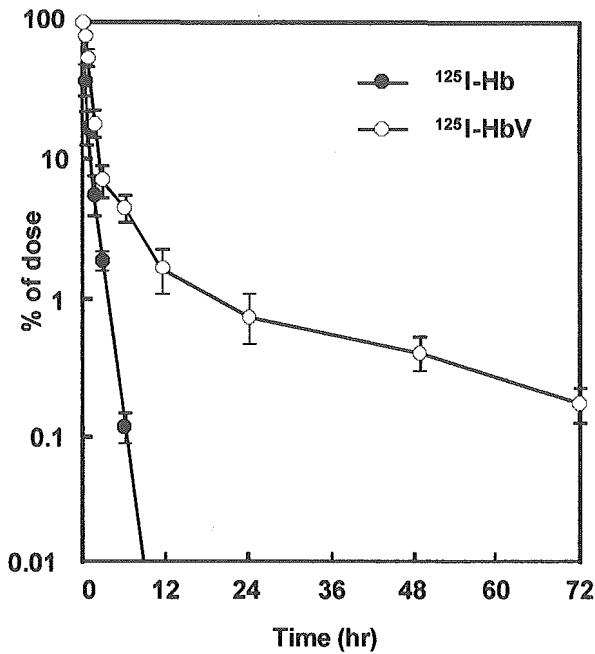


Fig. 1. Relative plasma concentration of  $^{125}\text{I}$ -Hb and  $^{125}\text{I}$ -HbV after i.v. administration to mice.  $^{125}\text{I}$ -Hb (●) or  $^{125}\text{I}$ -HbV (○) were injected at a dose of 1mg/kg. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6).

Table 1. Pharmacokinetic parameters of  $^{125}\text{I}$ -Hb and  $^{125}\text{I}$ -HbV after i.v. administration to mice. Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6). a;  $p < 0.05$ , b;  $p < 0.01$ , c;  $p < 0.001$  vs.  $^{125}\text{I}$ -Hb.

	$^{125}\text{I}$ -Hb	$^{125}\text{I}$ -HbV
$t_{1/2}$ (hr)	$0.1 \pm 0.1$	$3.1 \pm 1.0^b$
AUC (hr $\cdot$ % of dose/mL)	$7.9 \pm 3.9$	$29.4 \pm 9.2^c$
CL (mL/hr)	$127 \pm 21$	$3.4 \pm 0.1^c$
$V_{ss}$ (mL)	$13.8 \pm 0.1$	$10.8 \pm 0.9^a$

Hb を小胞体化することによる、Hb 血中滞留性の変化について検討した。 $^{125}\text{I}$ -Hb は投与後速やかに血漿中より消失するのに対して、 $^{125}\text{I}$ -HbV は長時間滞留し、消失相 ( $\beta$  相) から算出した半減期は、約 30 倍に延長していた (Fig. 1)。また、血漿濃度曲線下面積 (AUC) は約 4 倍に増大し、一方で全身クリアランス (CL)、分布容積 ( $V_{ss}$ ) は有意に減少した (Table 1)。このときの主要臓器への分布は Hb を小胞体化することにより、腎臓及び肝臓への移行が

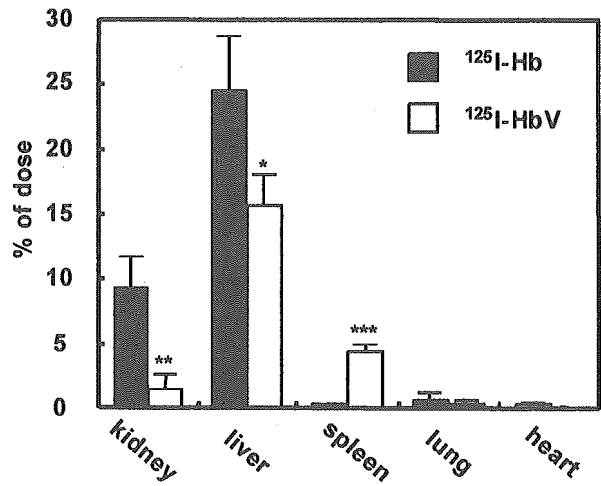


Fig. 2. Organ distribution of radioactivity at 10min after i.v. administration of  $^{125}\text{I}$ -Hb or  $^{125}\text{I}$ -HbV to mice.  $^{125}\text{I}$ -Hb (closed column) or  $^{125}\text{I}$ -HbV (open column) were injected at a dose of 1mg/kg. Each column represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6). \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$  vs.  $^{125}\text{I}$ -Hb.

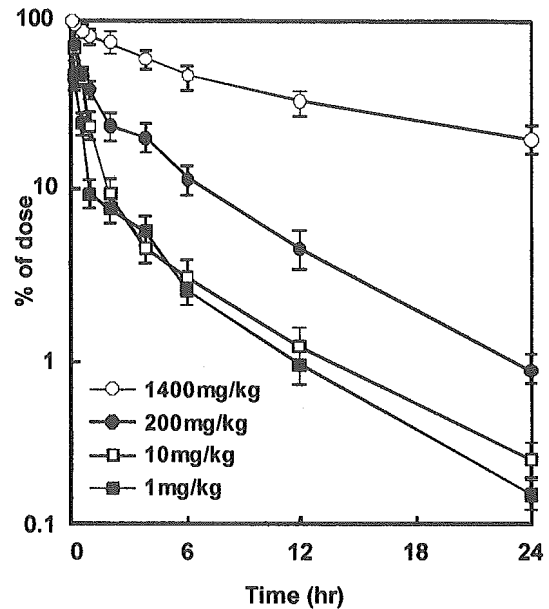


Fig. 3. Relative plasma concentration of  $^{125}\text{I}$ -HbV after i.v. administration to mice.  $^{125}\text{I}$ -HbV were injected at a dose of 1 (■), 10 (□), 200 (●) and 1400mg/kg (○). Each point represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6).

著しく抑制された一方、脾臓への分布が、有意に増大した (Fig. 2)。

## 2. HbV の投与量依存性

次に  $^{125}\text{I}$ -HbV の体内動態の投与量依存性について検討した。投与量増大とともに血中滞留性は向上し、消失半減期は 1400mg/kg の投与量において、

**Table 2.** Dose dependent pharmacokinetic parameters of  $^{125}\text{I}$ -HbV after i.v. administration to mice. Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6).

	dose (mg/kg)			
	1	10	200	1400
$t_{1/2}$ (hr)	3.1 $\pm$ 3.1	3.6 $\pm$ 1.3	7.2 $\pm$ 3.1	18.8 $\pm$ 1.3
AUC (hr $\cdot$ % of dose/ mL)	29.4 $\pm$ 72	32.9 $\pm$ 38	134 $\pm$ 72	829 $\pm$ 38
CL (mL/hr)	3.40 $\pm$ 0.1	3.04 $\pm$ 0.1	0.74 $\pm$ 0.1	0.12 $\pm$ 0.1
$V_{ss}$ (mL)	10.8 $\pm$ 0.2	8.33 $\pm$ 0.3	6.91 $\pm$ 0.2	2.69 $\pm$ 0.6

**Table 3.** Kp values of  $^{125}\text{I}$ -HbV in each tissue at 8hr after i.v. administration to mice. Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=6).

tissue	Kp (mL/g of tissue)
kidney	0.27 $\pm$ 0.04
liver	1.76 $\pm$ 0.28
lung	0.17 $\pm$ 0.06
heart	0.08 $\pm$ 0.01
spleen	2.80 $\pm$ 0.56
pancreas	0.06 $\pm$ 0.01
skin	0.04 $\pm$ 0.01
muscle	0.03 $\pm$ 0.01
thyroid	0.14 $\pm$ 0.03
stomach	0.01 $\pm$ 0.01
large intestine	0.01 $\pm$ 0.01
small intestine	0.03 $\pm$ 0.01
brain	0.01 $\pm$ 0.01

19時間まで延長した(Fig. 3)。さらに AUC の増大、CL 及び  $V_{ss}$  の低下が認められた (Table 2)。また投与後、8 時間後における組織対血漿中濃度比 (Kp) は、主に肝臓、脾臓へ分布し、腎臓、肺においてもわずかな分布が認められた (Table 3)。また、尿、糞中への排泄について検討した結果、投与後 72 時間までに、投与量の約 80% が尿中へ排泄され、糞中への排泄は殆ど認められなかった (Data not

shown)。また、HbV の主要な代謝臓器であると考えられる肝臓、脾臓について、取り込みクリアランスを算出したところ、肝臓、脾臓において、投与量依存的に減少し、腎臓、肺においてはこのような傾向は認められなかった (Table 4)。

### 3. HbV の細胞取り込み・分解

一般に、リポソーム製剤は肝臓、脾臓等の貪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. 4)。

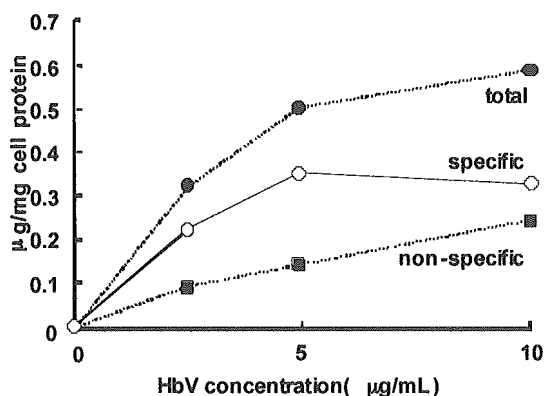
### 4. HbV 構成脂質の体内動態解析

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 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 はほぼ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. 5, Table 5)。

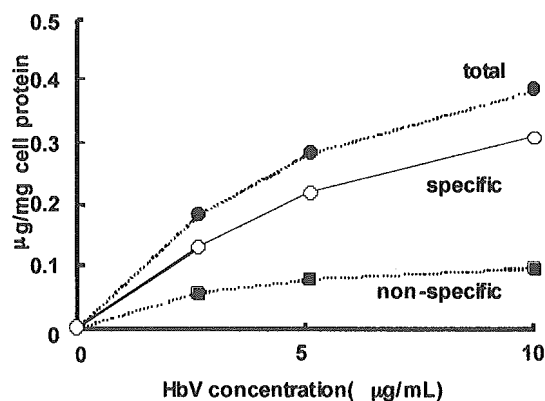
**Table 4.** Dose dependent uptake clearance of  $^{125}\text{I}$ -HbV after i.v. administration to mice. Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6).

dose (mg/kg)	CL <sub>uptake</sub> ( $\mu\text{L/hr}$ )				
	liver	spleen	kidney	lung	heart
1	2608 $\pm$ 654	1018 $\pm$ 188	7.6 $\pm$ 9.4	3.5 $\pm$ 0.9	0.14 $\pm$ 0.06
10	1473 $\pm$ 440	786 $\pm$ 94	18 $\pm$ 8.1	2.5 $\pm$ 0.2	0.38 $\pm$ 0.09
200	452 $\pm$ 114	102 $\pm$ 36	25 $\pm$ 9.2	1.3 $\pm$ 0.2	0.06 $\pm$ 0.02
1400	256 $\pm$ 37	51 $\pm$ 6.1	27 $\pm$ 9.4	0.6 $\pm$ 0.2	0.14 $\pm$ 0.06

**A. uptake**



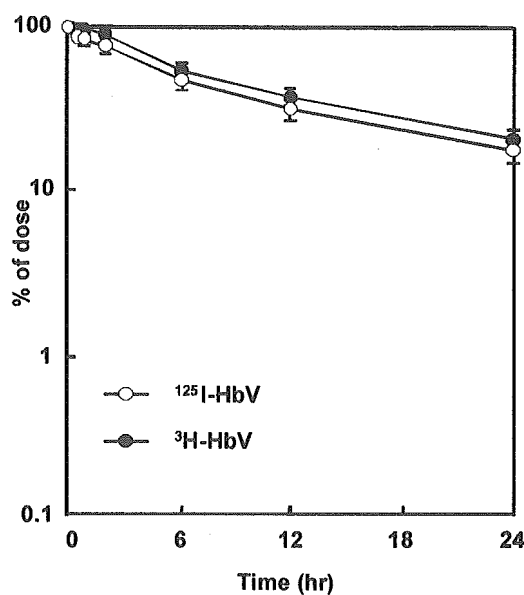
**B. degradation**



**Fig. 4.** 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.

**Table 5.** Pharmacokinetic parameters of  $^{125}\text{I}$ -HbV and  $^3\text{H}$ -HbV after i.v. administration to mice. Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6).

	$^{125}\text{I}$ -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



**Fig. 5.** 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)

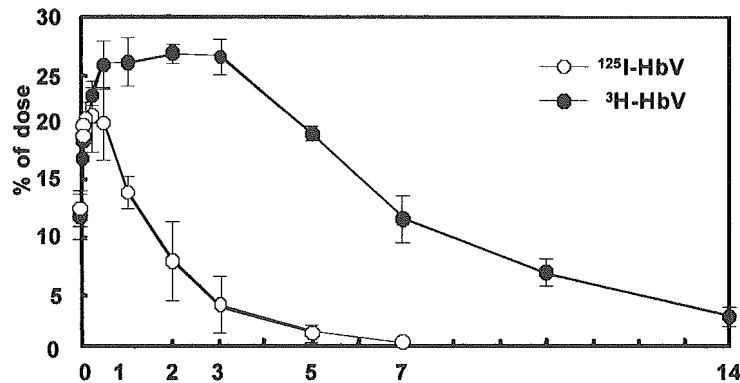
**Table 6.** Uptake clearance of  $^{125}\text{I}$ -HbV and  $^3\text{H}$ -HbV after i.v. administration to mice. Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3-6)

	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

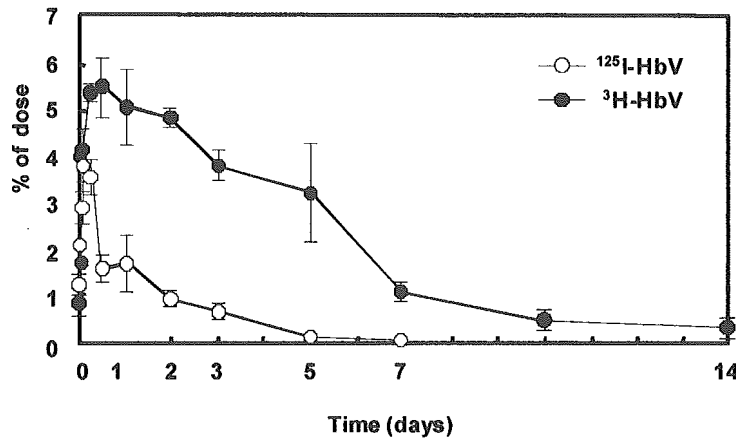
**Table 7.** Urinary and fecal excretion ratio of  $^{125}\text{I}$ -HbV or  $^3\text{H}$ -HbV after i.v. administration to mice. Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=3). a; p<0.01 vs.  $^{125}\text{I}$ -HbV.

	% 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>

**A. liver**

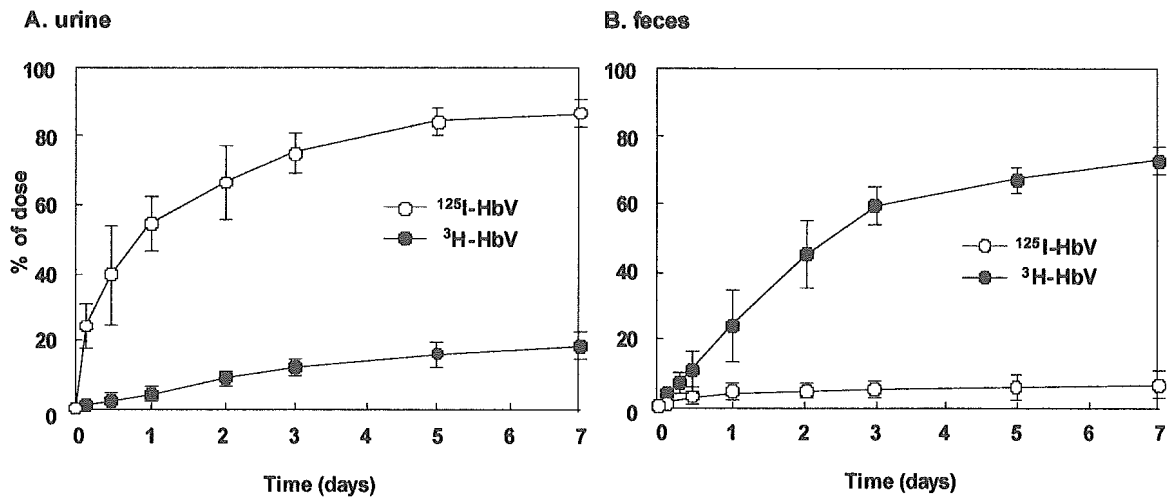


**B. spleen**



**Fig. 6.** 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).





**Fig. 7.** 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).

次に、肝臓、脾臓による取り込みクリアランスを算出したところ、 $^{125}\text{I-HbV}$  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 6)。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た (Fig. 6)。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  $^3\text{H-HbV}$  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. 7, Table 7)。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、酸素運搬機能および安全性に優れた人工血液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。Hb 溶液を脂質膜で小胞体化することにより、消失半減期は 30 倍に延長し、血中滞留性が大幅に改善された (Fig. 1, Table 1)。これは、肝臓及び腎臓における分布、排

泄が著しく低下したことによると考えられる (Fig. 2)。通常生体内において、溶血により血漿中へ放出された Hb はハプトグロビンと呼ばれる血漿タンパク質と結合し、肝実質細胞へ取り込まれ、それ以外の Hb は速やかに二量体へ解離し、糸球体のサイズバリアーを潜り抜けることで尿中へ排泄される。従って、Hb は血漿中において極めて不安定であるが、HbV においては、脂質膜によりハプトグロビンとの反応が制御されるとともに、Hb の血漿中での解離、排泄が抑制され、その結果、肝実質細胞及び腎糸球体濾過への移行が有意に抑制されたと考えられる。一方で、小胞体化により脾臓への分布は有意に増大し、また、各臓器への分布に関する検討から、肝臓 (クッパー細胞) 及び脾臓 (マクロファージ) が HbV の主要な捕捉分解臓器であることが確認された (Fig. 2, Table 3, 4)。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. 4)。一般に、リポソーム製剤は肝臓、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、脾臓に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 6)。しかしながら、投与後数時間から両者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. 7)。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. 8, Table 7)。このような結果から、小胞体として肝臓、脾臓の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、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

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 構成成分の代謝・排泄過程を初めて明らかにし、酸素運搬機能と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

## 8. Hb 小胞体投与による臓器微小循環系および組織内酸素代謝動態への影響の検討

### 8-1. ラット出血性ショックにおける Hb 小胞体投与による肝微小循環動態および肝細胞機能に対する影響

#### A. 研究目的

本研究では、実際の臨床現場での使用状況に近いと考えられる、循環血液量の 40% 程度の出血によるショックに対して Hb 小胞体(HbV)を投与する場合に、どの分散溶媒を使用すれば投与効果が認められるか検討することを目的とした。全身循環動態の変化のみならず HbV 投与により最も影響を受ける可能性のある臓器の微小循環動態および胆汁排泄機能変化を経時的に観察し、その生体適合性を明らかにすることを目的とした。

#### B. 実験方法

Wistar 系雄性ラット (290g±30g) を使用し、ペントバルビタールを筋肉内投与し麻酔後、Wigger's hemorrhagic shock model に従い循環血液量の 40% 相当の脱血を 10 分間かけて頸動脈より行うことで全身血圧を 40mmHg 以下のショック状態に 15 分間維持し、その後 10g/dl の HbV 溶液を 1.2~1.4ml/min で 5 分間かけ頸動脈より投与した。HbV 投与前後の全身平均血圧変化を頸動脈に挿入したカテーテルを介して経時的にモニタリングした。また、HbV 投与により最も影響を受ける臓器の一つである肝臓における胆汁排泄機能変化(胆汁排泄流量)を総胆管に PE10 を留置することで、また肝類洞微小循環動態変化を共焦点顕微鏡による *in vivo* imaging 法により経時的に観察した(Fig. 1)。

また、本研究では HbV の分散溶媒の適合性を検討するために、①生理食塩水(PS)、②酸素を運搬せず、浸透圧が HbV とほぼ同程度と考えられるリポソーム溶液(生理食塩水分散)、③HbV/PS(HbV を生理食塩水に分散)、④アルブミン溶液(Alb)、⑤HbV

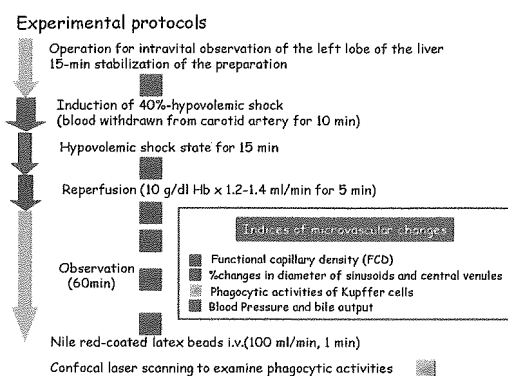


Fig. 1. Experimental Protocol

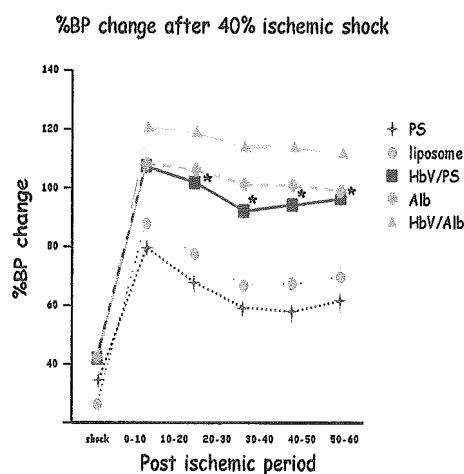


Fig. 2. ラット 40%脱血ショック後の全身平均血圧の変化

/Alb(HbV をアルブミン溶液に分散)をそれぞれ使用しその効果を比較検討した。

(倫理的配慮) 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. 研究結果および考察

循環血液量の 40%を脱血したショックモデルにおいて HbV/PS 投与群では投与後速やかに全身平均血圧の回復が認められ、その持続効果が少なくとも 1 時間以上認められた(Fig. 2)。これに対して、PS 群およびリポソーム群では、平均血圧は投与後一過性に約 80%程度の回復が認められるものの、

Bile output ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  liver) after 40% ischemic shock

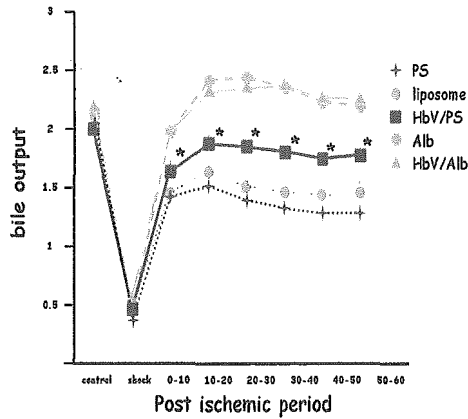


Fig. 3. 出血ショック-蘇生液投与後の胆汁排泄量の変化

FCD in post-ischemic hepatic microvascular damages

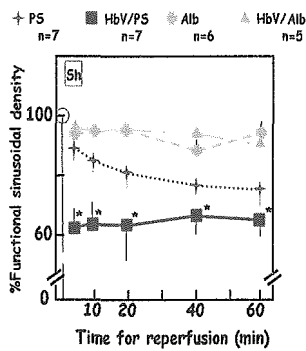


Fig. 4. HbV 投与による肝微小循環における有効類洞血管床(FCD: Functional Capillary Density)の変化

Sinusoidal diameters in post-ischemic hepatic microvascular damages

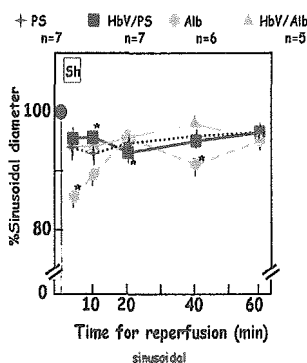


Fig. 5. HbV 投与による循環類洞血管径の変化

持続せず、その後約 60-70%の低値を示すことが明らかになった。一方、酸素運搬能のない Alb 溶

液単独投与でも HbV/PS と同等の血圧回復効果が認められた。また、HbV を Alb 溶液に分散した HbV/Alb 投与では、HbV/PS あるいは Alb 単独投与と比較し相加的な血圧の上昇・維持が認められた (Fig. 2)。以上の結果より、酸素運搬と浸透圧がそれぞれ別の機序であるが相加的にショック後の血圧の回復・維持に役立っていることが明らかになった。

次に、HbV 投与による肝臓機能回復効果を解析するために、酸素運搬の指標と考えられる胆汁排泄流量を経時的に測定した。その結果、HbV/PS 投与により胆汁排泄流量はほぼショック前の排泄流量まで回復が見られた (Fig. 3)。この効果は、PS あるいはリポソーム投与群では減弱し、回復率はショック前の約 75%に留まった。一方、Alb 単独および HbV/Alb 投与群では胆汁排泄流量はショック前と同等あるいはそれを越えたレベルまで回復が認められた。また、これらの回復効果は、HbV/PS 投与のそれよりも増強が認められた (Fig. 3)。以上の結果により、肝臓における胆汁排泄機能は、全身血圧調節機構と同様に酸素運搬能と浸透圧効果がそれぞれ別のレベルで作用しているが、浸透圧効果の方が酸素運搬能と比較して大きく、相加的ではないことが明らかになった。

最後に、ショック後の HbV 投与による肝類洞微小循環動態に対する効果を、共焦点顕微鏡を用いた *in situ, in vivo* imaging 法により検討した。その結果、HbV/PS 投与群では肝内類洞微小循環において観察視野内の約 60-70%に部分的な血流障害が認められた (Fig. 4)。一方、Alb 単独あるいは HbV/Alb 投与群では、HbV/PS において見られた類洞血管における不均一な循環動態が認められず、ほとんど全ての類洞において血流循環が維持されていた。一方、類洞血流が維持されている血管床における血管径の変化を画面上にて測定したところ、生食投与群を含め溶液の性質に関係なく類洞血管径の有意な変化は認められなかった (Fig. 5)。

以上の結果より、HbV/A1b あるいは A1b 単独投与群と比較して HbV/PS 投与群の方がショック後の胆汁排泄流量維持に対してより有効に作用しなかった原因は、HbV 投与により肝内レジデントマクロファージである Kupffer 細胞の活性化に起因した Kupffer 細胞の膨大化により類洞が閉塞しやすくなり結果的に肝内有効類洞血管床が減少したためであると考えられた。

#### D. 結論

ショック後の全身血圧、胆汁流量、Functional Sinusoidal Density の結果から、循環血液量の 40% を脱血したショックモデルにおいても、人工赤血球 HbV の分散溶媒としては 5%アルブミン溶液を使用するのが最適であると考えられた。また、アルブミン溶液を使用することで血中滞留時間の延長や全身状態の一層の改善が期待されると考えられた。

### 8-2. マウス一過性脳虚血モデルを用いた脳組織内血管透過性に対する Hb 小胞体の影響

#### A. 研究目的

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

#### B. 実験方法

8-11 週齢の C57/BL6 雄性マウスを使用し、*a*-chloralose (60mg/kg) および urethane (600mg/kg) を腹腔内投与し麻酔後、気道確保のために気管切開を行った。大腿静脈にカニューレーション後、Hb を含有しない空の小胞体 (5ml/kg) を投与し、その後両側総頸動脈を結紮し 1 時間血流を遮断した。再灌流直後に Evans blue (EB: 50mg/kg) を投与し、その後 4 時間再灌流を行った。EB は血液中ではそのほとんどがアルブミンと結合した状態であることが知られている。そこで、虚血・再灌流障害による局所血管透過性変化を評価するために各臓器に蓄積した EB の定量を次の方法にて行った (改変 Miles assay 法)。4 時間の再灌流後、37°C に暖めた 100mM クエン酸溶液 (pH3.5) を 12ml/min で 3 分間心臓より灌流した。その後、各臓器を摘出しその湿重量を測定した。350mg の各臓器を 0.5ml フォルマミド溶液に浸し、その後 55°C に暖めた震盪恒温槽中に一晩放置することで組織に蓄積した EB を抽出した。EB の絶対量を算出するために、620nm における吸光度とリファレンスとして 750nm における吸光度を測定し、その差  $OD_{620-750}$  を EB の相対吸光度とした。濃度既知の EB を用いて検量曲線を作成して、各臓器に蓄積した EB を算出した。

倫理的配慮：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. 研究結果および考察

生理的な状態では、fenestration 構造を持つ血管内皮細胞で覆われた微小循環系を有する肝臓や腎臓は、EB 投与後 4 時間で 20-30ngEB/mg tissue の蓄積を認めた。一方、血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)を有する脳組織では、肝臓や腎臓で認められた 1/30 以下に相当する EB ( $0.73 \pm 0.09$ ngEB/mg tissue) しか蓄積しないことが明らかになった (Fig.

6)。

血液中の EB の大部分がアルブミンなどの分子と結合して存在することを考えれば、これらの所見は本研究で用いた改変 Miles assay 法が脳などの fenestration 構造を有しない血管内皮細胞を持つ臓器における血管透過性機能の評価系として用いることが出来る有効な方法であると考えられた。

そこで、この方法を用いてマウス両側総頸動脈を結紮し一過性脳虚血モデルを作成し、再灌流後の脳血管機能の変化を解析した。その結果、この脳虚血・再灌流傷害により、肉眼的にびまん性であるが片半球により強い著明な EB の漏出が認められた (Fig. 6, 7)。定量の結果、非結紮群と比較して約 10 倍量に相当する  $7.5 \pm 0.5$  ngEB/mg tissue の脳組織への蓄積が明らかになった。一方、肝臓、腎臓および肺における血管透過性はこの処置により特に変化は認められなかった (Fig. 7)。これらの結果より、一過性脳虚血・再灌流傷害はマウス脳血管障害を惹起することで脳循環における血管透過性を著しく亢進させることが明らかになった。

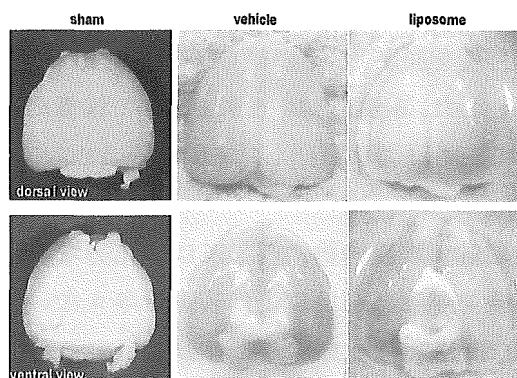


Fig. 6. マウス脳虚血・再灌流障害モデルにおける Evans Blue 漏出のマクロ所見

次に、局所血管透過性に与える小胞体の影響の有無を解析するために、脳虚血前に大腿静脈より空小胞体 (5ml/kg) を投与し同様に検討した。その結果、空小胞体投与により脳組織における EB の蓄積は著明に減少し肉眼的には片半球のみに限局することが明らかになった。また、定量的な解析で

は、非投与群と比較して有意に減少し  $4.8 \pm 0.7$  ngEB/mg tissue の EB の蓄積が存在することが示された。一方、空小胞体投与によるこの血管透過性変化は解析した他臓器では認められなかった (Fig. 6, 7)。

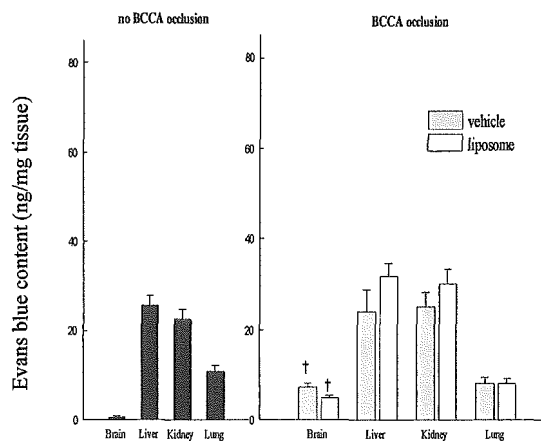


Fig. 7. マウス脳虚血・再灌流障害モデルにおける血管透過性に対する小胞体の効果

以上の結果は、小胞体自身が血管透過性亢進を惹起しうる局所血管障害を抑制する付加的な機能を有していることを示していると考えられた。今後 HbV を用いて更に検討を行い、局所への酸素運搬能を亢進させた場合、脳循環系における血管内皮細胞機能への如何なる変化が惹起されうるかを明らかにしていく予定である。

#### D. 結論

局所への酸素運搬能を亢進させることに主眼がおかれ開発された HbV は、病態下の血管内皮細胞機能、特に血管透過性を抑制する付加的な機能を有していることが明らかになり、今後単なる輸血の代替物としてのみならず、未知の利用価値が更に賦課された生理機能物質として幅広い臨床応用が期待される。

### 8-3. Hb 小胞体投与後の組織内代謝動態解析

#### A. 研究目的

Hb 小胞体(HbV)は末梢臓器の隅々まで酸素を効率よく運搬することを主眼におき開発され、これまでにその生体投与に関する有効性と安全性について様々な角度より検討がなされてきた。しかし、これまでの検討は主に予測される変化をもとに測定パラメーターを事前に決め解析しており、得られる情報には限界があった。HbV 投与による臓器の機能変化を包括的に理解するためには、DNA 塩基配列の網羅的解析(ゲノム解析)やタンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)のみならず、時々刻々と劇的に変化する細胞内代謝物質の網羅的解析(メタボローム解析)を行い理解することが重要である。そこで平成 17 年度は、HbV 投与後の臓器代謝変動を近年開発されたキャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)を用いて解析することとした。特に本研究では生体内の代謝の中心臓器である肝臓に絞って測定を行った。

#### B. 実験方法

9~11 週齢の C57/BL6 雄性マウスを使用した。実験当日まで食事および飲水は自由に行わせ、全ての処置を午前中に行った。まず、無麻酔下にマウスを保定器に固定後、尾静脈よりマウスの循環血液量の 20%に相当する HbV あるいは空小胞体 (0.3ml/mice) を投与した。小胞体投与前および投与後 1、3、7 日目に、頸椎脱臼により屠殺後速やかに脳、肺臓、心臓、肝臓、脾臓および腎臓を採取し-80°C に保存した。先ず、肝臓凍結組織 300mg を、内部標準物質として終濃度 300  $\mu$ M の L-methionine sulfone、および 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)を含む 1ml のメタノール中でホモジナイズした。そこに 0.5ml の滅菌蒸留水を加えた後、激しく混和した。この懸濁溶液 0.3ml を新しいチューブに分け、0.2ml のクロロホルムを加えさらに激しく混和した。次に 4°C 下で 15,000

回転 15 分間遠心後上清を採取し、これをさらに分子量 5kDa 以下を分離できるフィルター付き遠心管(Ultrafree-CL; Amicon)を用いて遠心を行い、5kDa 以下の分画を採取した。採取した検体は測定まで -80°C に保存した。測定前に採取した 5kDa 以下の分画 50  $\mu$ l を冷却機能付き真空遠心機にて液相を蒸発させた後ペレットを再度蒸留水 50  $\mu$ l に懸濁した。これを Agilent Technologies 社の CE-MSD システムにかけ測定を行った。本システムでは、陽イオンおよびヌクレオチドはフューズドシリカキャピラリーを用いて、陰イオンは SMILE(+)キャピラリーを用いて測定を行った。測定結果を Agilent Technologies 社のケミステーションを用いて解析した。

倫理的配慮：実験動物に関しては、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. 研究結果および考察

本実験では CE-MSD システムを用いて、34 種の陰イオン、56 種の陽イオンおよび 31 種のヌクレオチドを一つの検体から一挙に測定を試みた。陰イオン低分子化合物は主に、解糖系、TCA 回路およびペントースリン酸回路の代謝産物を、陽イオン化合物はアミノ酸代謝産物を、ヌクレオチドは ATP、CoA 体をはじめとする代謝産物が含まれている。しかし、親水性の低い脂質代謝産物は本方法では殆どイオン化されないため測定が不可能である。また、測定感度は解析上 nM オーダーまで可能と考えられた。

この方法を用いて、HbV あるいは空小胞体投与後のマウス肝臓における代謝変動を経時的に解析した。その結果を **Table 1** に示す。HbV 投与により惹起される陰イオン代謝産物の動態変化については、TCA 回路のフマル酸、リンゴ酸が投与後 1 日目より 7 日目まで持続的に上昇する傾向が認められた。一方、尿素回路のアロステリック因子であ

る N-アセチルグルタミン酸は投与後より持続的に低値を示すことが明らかになった。空小胞体投与では、TCA 回路のフマル酸、リンゴ酸の上昇は一過性で、グルコース 6 リン酸以下乳酸に至るほぼ全ての解糖系代謝産物の低下が投与後 7 日目に認められた。

陽イオン代謝産物への影響については、グリシン、タウリン、ヒポタウリンの持続性の低下と投与後 7 日目の還元型グルタチオンの低下が認められた。一方、空小胞体投与ではグリシンとグルタチオンの挙動は共通して認められたが、タウリンとヒポタウリンの低下は投与後 7 日目にのみ認められた。

最後に、HbV 投与によるヌクレオチド・CoA 体代謝物への影響については、AMP、GMP の投与後 1 日目の一過性上昇、UDP、GDP の投与後 1 日目の一過性減少、ATP、GTP、UTP および CTP の投与後 1 日目から 3 日目に掛けての減少が認められた。また、アセチル CoA の 3 日目の減少とマロニル CoA の 1~3 日目の減少も認められた。さらに、ADP/ATP の投与後 1 日目の急激な増加と NAD/NADH の時間依存性の緩徐な増加が明らかになった。一方、空小胞体投与では CoA 体の変動は HbV 投与時とほぼ同様な変動を示したが、ヌクレオチド類の変動は遅延して認められた。また、ADP/ATP と NAD/NADH は投与後 7 日目に向かい増加することが明らかになった。

以上の結果より、HbV 投与後には肝臓内エネルギーの一過性の急激な消費と抗酸化作用を有する含硫アミノ酸代謝産物の低下が惹起されるものの、それ以外では肝臓内代謝機能にあまり大きな影響は与えないものと思われた。この現象は、HbV 投

与により肝臓内で一過性の酸化ストレス生じることでエネルギー産生系の傷害が起きたものと考えられる。また、タウリンやヒポタウリンの低下が持続した原因は小胞体の脂質成分の負荷が一時的に起き、その結果余分な脂質を胆汁中に排泄するために生じたものと考えられる。しかし、詳細な分子メカニズムについては別の角度からの検索が必要であり今後の課題として残された。

#### D. 結論

今回利用した網羅的メタボローム解析技術は、時々刻々に劇的に変化する組織内代謝動態を正確に理解するツールとして非常に有用であることが明らかになった。今回行った HbV の投与方法では何らかの負担を生体に強いることになるが、排泄経路の活性化と一過性のエネルギー消費の増加以外に大きな影響をもたらすことが無いことが明らかになった。しかし、一方で空小胞体単独投与ではエネルギー産生系の異常に繋がる代謝変動が遅延して認められることが明らかになってきた。この点については、長期間の代謝変動の追跡と小胞体製剤投与量との相関について詳細な検討を行うべきである。また、今後肝臓以外の臓器に対する影響を詳細に解析することで、生体機能全体に及ぼす変化を検討する必要がある。

#### E. 健康危険情報

特になし



**Table 1-1** CE-MS による肝臓代謝動態の解析結果 (陰イオン・陽イオン)

陰イオン	Pre	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体
		day 1	day 1	day 3	day 3	day 7	day 7
Pyruvate ( $\mu\text{M}$ )	6.584±1.576	9.985±3.957	9.402±20.65	11.31±3.221	9.575±3.582	8.988±4.823	6.850±0.793
Lactate	1902±37.47	1610±77.59	1972±304.2	1574±379.1	1791±242.4	1866±43.14	1349±68.44
$\alpha$ -ketobutyrate	7.101±0.065	5.027±0.381	5.666±2.747	<4.077	4.049±0.824	<8.437	<2.718
$\beta$ -Hydroxybutyrate	5.415±3.119	6.489±2.974	3.726±2.437	<4.996	4.369±1.274	6.015±7.058	<13.70
Fumarate	15.90±2.303	34.39±13.34	22.18±3.898	32.36±11.57	42.80±5.725	30.18±10.45	24.93±4.007
Succinate	214.5±18.79	215.4±10.23	217.5±23.14	233.2±8.716	223.3±23.37	224.4±33.26	176.2±8.394
Malate	49.22±9.710	98.09±30.79	55.61±31.41	109.7±22.46	126.6±48.58	84.78±55.33	55.82±13.27
2-Oxoglutarate	0.872±0.082	0.641±0.258	<0.626	<0.746	<0.552	ND	ND
Dihydroorotate	ND	ND	ND	ND	<0.463	ND	ND
Phosphoenolpyruvate	8.992±1.489	8.240±1.643	9.822±1.142	7.926±2.394	10.03±1.353	7.058±0.070	5.661±0.670
Dihydroxyacetonephosphate	<0.500	<0.526	<0.510	<0.569	<0.687	<0.427	<0.567
Glycerophosphate	386.1±20.16	377.2±48.07	317.1±26.64	335.3±35.90	340.3±39.98	451.4±22.85	396.5±6.835
cis-Aconitate	0.466±0.205	0.462±0.164	0.842±0.288	0.891±0.259	0.392±0.333	<0.298	0.305±0.037
Carbamoyl aspartate	0.524±0.021	<0.423	0.488±0.248	<0.289	0.364±0.052	ND	<0.461
3-Phosphoglycerate	13.47±1.529	13.47±1.501	15.25±1.210	11.19±5.680	15.63±2.508	10.14±3.212	7.963±2.299
2-Phosphoglycerate	1.014±0.078	1.208±0.306	1.796±0.962	<0.834	1.408±0.217	1.328±0.309	<0.799
N-Acetylglutamate	13.41±1.173	6.785±0.439	9.757±2.156	8.236±2.004	<9.395	7.344±1.989	6.252±0.793
Erythrose 4-phosphate	1.198±0.080	<0.994	<2.968	ND	<0.740	ND	<2.1025
Porphobilinogen	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ribulose 5-phosphate	7.494±4.322	3.923±0.727	2.159±1.676	2.637±1.103	3.079±1.051	4.206±3.309	<10.68
Ribose 5-phosphate	ND	ND	ND	ND	ND	<0.619	ND
Pyridoxal 5'-phosphate	3.664±0.159	3.339±0.305	3.831±1.090	2.529±1.968	3.627±0.768	5.642±1.478	2.384±0.621
Galactose-1-phosphate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-Glucosamine 6-phosphate	2.397±0.425	2.929±0.557	<2.420	ND	2.236±0.737	<4.472	<1.165
Glucose 1-phosphate	12.30±1.097	13.43±1.769	12.36±2.277	11.21±0.964	12.76±2.863	13.94±3.502	11.05±0.972
Fructose 6-phosphate	45.30±0.004	48.15±2.325	41.75±3.453	44.60±5.899	48.67±6.212	47.42±5.838	36.07±1.510
Glucose 6-phosphate	104.8±6.141	97.16±2.866	94.47±15.76	97.56±17.86	102.2±9.951	103.7±12.22	85.66±4.099
2,3-Diphosphoglycerate	32.14±5.057	36.92±14.48	37.36±6.125	22.41±14.59	38.27±6.438	20.22±6.925	13.81±4.799
6-Phosphogluconate	5.274±1.058	6.963±0.546	6.144±1.091	5.653±0.272	7.276±1.186	5.854±0.748	5.702±0.502
Arginosuccinate	ND	ND	ND	ND	ND	<1.424	ND
Fructose 1,6-diphosphate	1.161±0.193	1.205±0.170	1.320±0.266	1.086±0.090	1.134±0.247	0.902±0.246	0.653±0.096
Fructose 2,6-diphosphate	20.92±4.347	14.67±1.540	18.45±4.084	11.65±4.630	12.74±1.678	14.79±2.945	13.06±1.571
5-Phosphoribosyl-pyrophosphate	13.72±0.625	9.190±1.926	<11.65	<13.64	11.80±3.418	<16.69	<18.85
Adenylosuccinate	1.279±0.088	6.419±3.925	1.741±0.837	4.178±1.035	5.227±0.864	2.960±2.351	3.145±0.107

陽イオン	Pre	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体
		day 1	day 1	day 3	day 3	day 7	day 7
Urea ( $\mu\text{M}$ )	793.6±83.65	697.9±66.46	973.1±281.8	1203±418.7	894.5±50.15	1022±327.0	836.7±186.3
Gly	656.9±27.83	397.1±39.42	474.2±19.60	465.0±56.44	454.8±14.23	545.2±72.07	423.7±22.98
Pyridine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pyrimidine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-Ala	485.1±46.57	431.1±75.28	449.5±39.38	491.0±79.44	463.8±20.12	541.6±87.77	406.5±30.26
GABA	12.05±2.041	11.99±2.552	11.85±1.565	12.41±0.475	11.18±0.802	13.91±1.370	10.83±0.560
Ser	67.08±5.260	54.75±9.848	49.44±3.504	68.40±7.083	64.61±10.31	64.37±5.522	60.81±3.404
Hypotaurine	283.3±24.69	137.3±55.26	193.9±59.36	177.3±40.05	228.2±52.16	157.8±19.03	107.1±9.756
Uracil	76.49±2.436	60.29±4.337	95.16±33.69	83.77±17.16	54.88±2.550	91.43±23.33	63.30±15.58
Creatinine	1.717±0.013	1.753±0.025	2.131±0.258	2.190±0.268	2.055±0.295	1.899±0.273	1.700±0.019
Dihydrouracil	1544±165.4	1699±422.6	2620±1591	4789±4334	1428±243.8	3383±1747	3104±2085
Pro	29.77±0.626	20.79±6.639	24.82±5.846	22.92±2.299	25.84±3.725	26.47±7.789	24.23±1.784
Val	65.59±0.513	53.56±10.70	51.14±6.226	53.05±2.351	67.21±2.002	42.79±6.166	56.49±2.344
Thr	50.52±3.411	45.30±11.15	42.13±4.789	49.82±1.196	53.76±4.850	38.94±5.242	42.74±2.092
Cys	<1.300	1.559±0.415	<2.218	<6.140	3.702±0.283	ND	<1.417
Taurine	932.1±15.15	670.6±237.2	1025±206.6	310.6±100.0	771.0±227.0	438.7±224.6	553.6±68.20
Oxoproline	4.737±0.453	5.536±0.540	7.179±1.581	7.454±1.988	5.179±0.633	9.250±2.192	7.363±0.695
5-Aminolevulinata	9.211±0.592	10.91±2.570	11.15±1.891	9.174±0.702	8.182±0.796	10.53±2.578	10.24±0.661
Creatine	28.03±6.119	35.72±3.991	49.53±14.27	66.42±21.39	57.69±22.41	63.13±23.55	50.28±4.436
Ile	34.44±0.816	24.36±4.828	24.29±2.680	22.16±1.561	29.99±3.391	20.70±2.286	28.69±0.923
Leu	62.71±2.632	52.86±13.16	48.38±8.138	51.37±2.210	60.70±8.245	50.58±8.086	59.84±3.454
Ornithine	49.13±0.557	42.38±8.286	41.42±9.845	46.80±3.035	48.38±4.366	39.28±10.11	39.17±3.609
Asn	17.05±1.840	17.30±4.018	15.16±3.343	15.84±0.916	15.21±2.795	20.16±1.552	20.36±1.273
Asp	61.17±1.167	65.31±10.79	54.73±6.519	73.30±8.711	60.71±13.20	89.70±10.40	80.73±3.406
Adenine	2.450±0.086	2.471±0.049	2.656±0.353	4.023±0.657	3.203±0.072	2.999±0.477	3.253±0.293
Homocysteine	ND	ND	<3.862	ND	ND	ND	<2.952

**Table 1-2** CE-MS による肝臓代謝動態の解析結果 (陰イオン・ヌクレオチド)

陽イオン	Pre	Hb小胞体		空小胞体		Hb小胞体		空小胞体	
		day 1	day 1	day 3	day 3	day 7	day 7		
Hypoxanthine	5.095±0.831	6.468±1.810	2.984±1.671	6.527±4.062	6.872±5.395	8.080±5.184	11.14±1.887		
Spermidine	8.030±0.361	7.98±0.657	9.925±2.149	7.888±1.168	7.758±0.588	8.813±1.351	7.198±0.789		
Lys	68.05±2.722	60.26±19.56	46.88±8.603	47.97±11.15	63.77±21.02	42.35±5.428	51.39±6.559		
Gln	523.7±11.52	491.8±53.20	438.1±68.28	622.2±218.4	434.3±42.46	672.4±72.29	623.1±95.02		
Glu	434.1±69.37	553.6±71.22	565.6±180.5	659.8±25.90	455.5±166.6	697.8±83.61	477.2±85.52		
Met	5.329±1.042	5.141±1.762	4.992±0.778	4.395±0.418	6.399±1.091	5.577±1.334	5.787±0.337		
Guanine	ND	<0.71	<1.19	<1.960	1.127±0.970	<1.564	<1.970		
His	66.99±1.532	60.00±6.355	61.40±5.555	73.98±16.66	64.82±11.27	70.03±17.25	63.77±5.552		
Allantoin	13.45±0.514	20.18±6.729	19.32±4.880	25.74±4.197	23.98±2.851	34.33±14.71	26.78±1.033		
L-Carnitine	30.59±1.928	22.28±2.513	29.73±6.300	34.19±4.176	26.97±3.048	28.92±7.699	23.82±1.651		
Phe	20.86±0.091	17.80±4.660	18.32±2.195	17.24±1.304	18.70±3.655	18.20±3.618	19.37±1.187		
Pyridoxine	0.151±0.001	0.1473±0.010	0.264±0.174	0.307±0.134	0.094±0.063	0.346±0.182	0.236±0.056		
Arg	1.400±0.123	1.722±0.600	1.562±0.251	2.523±0.382	2.150±0.562	2.606±1.163	2.032±0.156		
Citrulline	8.299±0.403	5.245±0.464	9.150±3.848	10.94±3.926	9.992±2.231	10.47±4.154	8.904±0.957		
Tyr	19.34±1.739	21.20±5.097	21.73±1.088	25.30±0.885	30.06±4.653	22.03±0.942	21.89±2.120		
DOPA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Spermine	2.508±0.083	2.028±0.415	2.447±0.550	1.287±0.556	2.003±0.059	2.292±0.112	1.579±0.285		
Tip	7.020±0.027	6.472±13.99	6.268±0.754	5.779±0.859	6.832±0.437	5.487±0.459	6.147±0.220		
Cystathionine	2.489±0.185	1.580±1.154	1.689±0.814	3.234±1.424	3.638±1.004	<1.709	<2.046		
5,6,7,8-tetrahydrobiopterin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Thymidine	0.772±0.230	<0.504	1.392±0.993	<1.999	1.624±0.232	2.790±1.329	2.247±0.383		
Cytidine	1.518±0.086	1.101±0.151	1.150±0.382	1.337±0.280	1.291±0.113	1.735±0.357	1.847±0.136		
Uridine	9.405±0.680	14.54±4.084	14.64±3.406	16.79±7.881	10.16±2.159	15.74±3.150	15.05±3.009		
Adenosine	29.39±1.287	29.22±2.700	40.43±11.79	51.80±22.24	30.66±1.857	55.38±22.89	50.74±10.19		
Inosine	29.77±4.422	26.76±7.144	20.59±11.65	21.71±3.289	38.26±25.97	54.92±2.716	47.13±11.47		
Guanosine	6.177±0.264	8.144±0.772	7.490±1.687	8.376±0.825	6.980±0.977	8.658±0.875	9.110±0.460		
Glutathione, reduced fom	1481±46.76	1387±276.5	1395±153.9	1136±114.5	915.7±112.1	920.4±125.0	830.2±23.45		
S-Adenosyl-L-homocysteine	14.06±2.414	9.723±19.41	11.55±1.497	11.59±0.833	12.40±1.501	9.698±2.652	8.062±0.385		
S-Adenosyl-L-methionine	30.99±3.087	24.05±4.618	27.85±11.05	26.80±5.749	19.96±3.833	30.72±6.859	29.50±3.737		
Glutathione, oxidized fom	529.8±101.5	377.0±12.20	409.3±12.54	534.1±80.82	598.8±103.4	370.7±5.487	458.3±47.31		

ヌクレオチド 類	Pre	Hb小胞体		空小胞体		Hb小胞体		空小胞体	
		day 1	day 1	day 3	day 3	day 7	day 7		
Citrate (μM)	11.23±0.144	14.08±7.439	19.93±8.630	18.19±3.210	17.48±11.16	17.87±0.697	14.58±4.060		
Isocitrate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
dUMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
TMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
UMP	70.90±7.918	106.4±28.80	85.32±8.746	72.08±11.70	75.71±20.06	87.24±8.407	86.88±5.869		
cAMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
cGMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
AMP	281.7±13.43	442.9±102.8	324.1±39.32	385.0±124.2	335.3±85.90	357.2±5.416	420.7±42.52		
IMP	118.2±4.851	124.2±23.87	100.8±17.06	104.4±17.25	121.0±30.47	155.7±1.818	157.0±7.691		
GMP	41.35±5.407	79.51±10.77	60.87±18.55	62.12±15.03	61.83±14.14	57.53±12.59	72.71±2.333		
Xanthosine 5-monophosphate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
NADPH	5.916±0.272	3.517±1.927	3.699±0.907	3.687±0.361	1.951±2.318	3.880±0.958	<2.934		
CoA	19.39±0.986	13.41±1.216	12.72±2.236	8.661±1.079	5.407±2.982	14.29±3.909	9.423±0.959		
UDP	37.51±0.278	18.90±5.581	35.45±7.536	20.15±4.281	23.57±5.045	33.37±13.14	24.43±1.702		
Acetyl CoA	11.20±1.537	8.790±1.857	5.801±0.730	3.865±0.808	3.031±0.189	8.432±2.626	5.893±0.337		
n-Propionyl CoA	0.193±0.192	0.307±0.091	0.165±0.094	<0.158	0.140±0.052	0.276±0.114	0.1737±0.034		
ADP	303.5±17.38	208.4±43.37	293.3±63.56	213.6±27.54	204.6±60.79	282.7±46.36	224.7±20.05		
Malonyl CoA	12.95±1.095	4.827±1.392	<8.103	6.955±0.882	6.251±3.193	8.660±4.703	<6.044		
Succinyl CoA	0.313±0.009	<0.168	ND	<0.122	<0.122	<0.136	<0.099		
GDP	40.97±4.016	22.39±4.606	35.65±12.02	26.27±7.584	28.28±8.280	37.79±12.38	29.74±2.386		
Flavin mononucleotide	0.757±0.138	0.698±0.113	<0.592	<0.552	0.558±0.055	0.749±0.181	<0.840		
CTP	6.052±1.943	1.228±0.556	3.308±1.901	1.816±0.820	2.278±1.355	3.813±1.593	2.040±0.540		
UTP	45.09±13.69	7.994±2.966	23.13±14.51	11.88±4.613	14.52±5.970	24.54±15.81	15.31±5.366		
ATP	264.5±44.27	94.73±27.47	210.8±87.76	122.7±37.14	127.3±56.62	208.9±98.37	137.3±25.52		
GTP	34.97±7.608	10.77±2.501	25.06±16.79	15.02±3.811	16.80±6.875	25.68±15.18	18.14±6.783		
UDP-glucose	98.69±8.760	123.3±8.996	110.0±26.46	112.3±7.957	111.2±2.920	123.2±15.88	134.0±12.40		
UDP-N-acetylglucosamine	81.14±5.595	95.28±8.616	91.90±6.695	84.85±6.835	70.75±3.276	92.67±0.471	98.20±2.016		
NAD	164.2±5.593	102.2±20.26	127.5±15.18	121.2±8.140	85.46±29.72	141.9±30.20	114.9±11.00		
NADH	160.5±6.553	104.3±9.579	83.61±10.38	95.08±11.41	63.80±27.30	93.78±5.525	74.65±9.488		
NADP	43.95±0.512	39.01±3.179	40.96±6.229	38.76±1.555	33.59±6.015	43.35±9.559	40.98±2.639		
FAD	16.12±1.085	13.27±0.723	14.34±2.355	10.91±0.462	10.89±0.369	14.17±1.146	14.49±1.121		

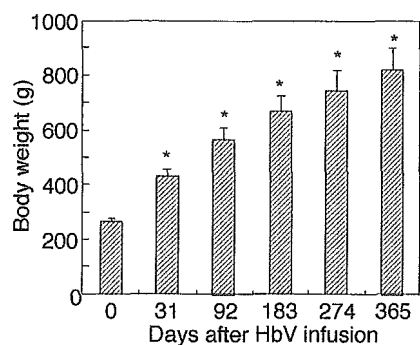
## 9. Hb小胞体単回投与1年後の血液生化学、組織病理学的検討

### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)の単回投与(20 mL/kg)、および反復投与試験(10 mL/kg/day x 14 days)の結果から、HbVは最終的に細網内皮系に捕捉され、分解消失することが組織病理学的検討から明らかにされている(Sakai *et al.*, *Am. J. Pathol.* **159**, 1079-1088, 2001; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 874-884, 2004)。特に非可逆的な副作用を認めず、安全性を示す知見が得られている。しかし、H15年10月に開催された第40回人工臓器学会(仙台)において、Nose博士(Baylor College)から、パーフルオロカーボン乳剤(PFC)投与例では、肺障害生起を認める場合もあり、1年を待たずに動物に死亡例が出るため、長期的観察は出来るだけ早期に実施すべき、との助言を得ている。そこで、同年11月にHbVを単回投与し、1年間の体重の推移と、H16年11月、1年経過後に犠牲死させ、血液生化学的検査と組織病理学的観察を実施した。

### B. 研究方法

Wistar rat (♂, 体重263 ± 8g) 5匹をエーテル麻酔下に、尾静脈よりHbV分散液20 mL/kgを留置針を経由して単回投与した。覚醒後、ラットを個別にケージに入れ、1年間飼育した。この間、体重の推移を観察した。1年経過後、Sevoflurane麻酔下に開腹

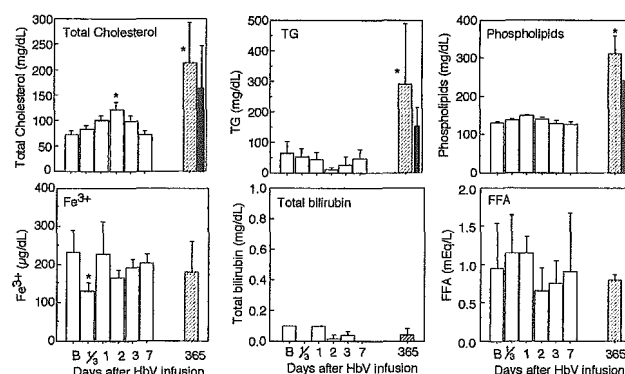


**Fig. 1.** Changes in body weight of the Wistar rats during one year following intravenous bolus infusion of HbV at a dose rate of 20 ml/kg. All the rats were housed individually in cages and provided with food and water *ad libitum*.

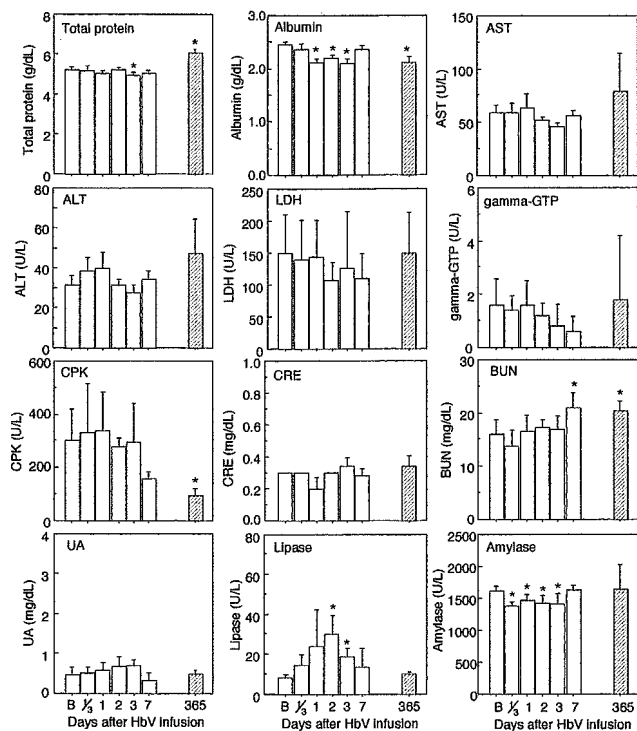
して、下大静脈より採血し、遠心分離をして血漿を得て、血液生化学検査を行った(BML社)。また放血犠牲死させ臓器を摘出、ホルマリン固定し、切片をH/E染色、Berlin-blue染色し、組織病理学的観察を実施。

### C. 結果および考察

ラットは全例が1年間生存し、体重は順調に増加し続け、最終的に821 ± 75 gまで増加した(Fig. 1)。血漿には乳糜があり、血液生化学検査の結果、脂質成分の著増が認められ明らかな高脂血症であった(Fig. 2)。今回対象動物を使用しなかったため、これらの増加がHbV投与に拠るかは不明である。一つの考え方として、比較的小さいケージの中で、接餌量を制限することなく1年間飼育したために肥満になったことが原因と考えられる。更にBreederのデータでも、1年後のラットでは高脂血症が認められているので、加齢による影響も強いと考えられる。既報のHbV単回投与(20mL/kg)の後の血液生化学検査では、投与1, 2日後一過性の血漿中脂質濃度増大が認められた(Sakai *et al.*, *Biomaterials* **25**, 4317- 4325, 2004)。これはHbVがマクロファージに捕捉されたあと、脂質成分が遊離したものであるが、7日目には正常値に戻った。今回の実験結果



**Fig. 2.** Changes in plasma levels of lipid components, iron, and bilirubin after intravenous bolus infusion of HbV into Wistar rats at a dose rate of 20 ml/kg. Data for 7 days (white bars) are cited from Sakai *et al. Biomaterials* 2004; **25**: 4317 -245. B, baseline. The values of black bars are from one-year-old rats housed in pairs in cages, not individually (cited from the breeder's data, Charles Rivers Co. Japan (2005). Crj: Wistar rats long term feeding tests.)

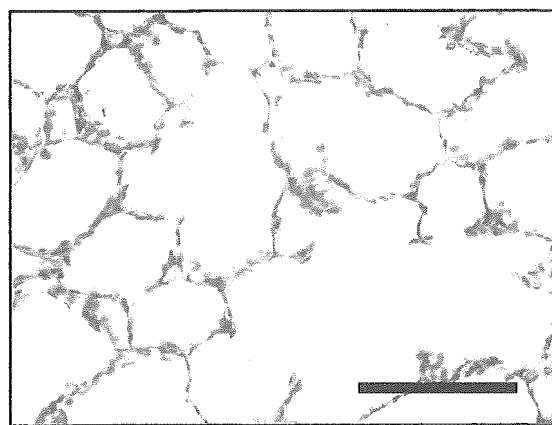


**Fig. 3.** Changes in plasma biochemical parameters after intravenous bolus infusion of HbV into Wistar rats at a dose rate of 20 ml/kg. Data for 7 days (white bars) are cited from Sakai et al. *Biomaterials* 2004;25:4317-245. B, baseline.

から、高脂血症の状態にあるラットに比較すれば1〜3日後の脂質濃度の増大は無視出来る程度であることが明らかになった。

その他、臓器機能を反映するパラメータの変動をFig. 3に示す。問題となるような変動は認められなかった。組織病理学的検討では、著変は認められなかったが、ヘモジデリン沈着が脾臓、副腎、腎臓に認められた。また、1例に下垂体腺腫が認められたが、これらは文献調査から全て老化による現象と考えられた(McFadden, *Growth* 30, 325-32, 1966; McComb et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 1143-66, 1984)。

また、肺には全例において全く異常を認めなかった(Fig. 4)。Nose博士らは、PFC乳剤の場合は、血液中での分散安定度が低く、粒子中に血漿蛋白質が吸着し、肺の微小循環系で塞栓形成することが肺炎を生起し、死亡例が出たと報告している(Nose, *Artif. Organs* 28, 807-812, 2004)。しかし、HbVの場合は、粒子表面がPEG鎖で修飾されているので、血



**Fig. 4.** Histology of lung one year after bolus infusion of HbV stained with hematoxylin / eosin. Scale bar, 100 μm.

中の分散安定度が高いので、凝集や塞栓の形成は認められない。

#### D. 結論

HbVを単回投与したあと、ラットは全例が生存した。血液生化学検査、組織病理学的検査では、肥満および老化による影響が見られたが、HbV投与に起因する異常は認められなかった。

### 10. Hb小胞体による40%交換輸血後の回復過程

#### A. 研究目的

これまでに交換率90%にもおよぶHb小胞体(HbV)による血液希釈を行い、急性期において赤血球と同等の酸素運搬機能を実証して来た。しかし90%の交換率は臨床的にはあり得ない。臨床で想定される血液交換率は、高くても40%程度であると考えられる。そこで本研究では安全性を明らかにすることを主目的とし、HbVをリコンビナントアルブミンに分散させた溶液を用いたラットの40%血液交換試験を行い、その後の回復過程について、特に脾臓にHbVが捕捉されて消失していく過程と、脾臓で