

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

(研究課題番号：H18-医薬-一般-022)

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小林 紘一

(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 20 (2008) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	1 - 7
小林 紘一（慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 小林 紘一（慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授）	8 - 14
2. 池田 久實（北海道赤十字血液センター 所長）	15 - 22
3. 小田切 優樹（熊本大学大学院 医学薬学研究部 教授）	23 - 32
4. 村田 満（慶應義塾大学 医学部 臨床検査医学 教授）	33 - 36
5. 高折 益彦（東宝塚さとう病院 名誉院長 / 川崎医大名誉教授）	37 - 38
6. 土田 英俊（早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員 / 早大名誉教授）	39 - 65
7. 酒井 宏水（早稲田大学 理工学研究所 准教授）	66 - 82
8. 山根 恒彦（㈱オキシジェニクス 京都研究所 主任研究員）	83 - 84
8. 高野 久輝（ニプロ㈱ 人工臓器開発センター センター長）	85 - 86
8. 甲斐 俊哉（ニプロ㈱ 医薬品研究所 製剤研究室 室長）	87 - 89
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	90 - 94
IV. 研究成果の刊行物・別冊	95

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

主任研究者 小林 紘一 慶應義塾大学医学部 外科 教授

研究要旨

実際の診療の中で輸血をはじめとする血液製剤を用いた治療は欠くことができない。血液製剤の中で最も多く使用される赤血球製剤の確保は、国民の健康維持に重要な課題である。特に赤血球製剤は保存に限界があるため、季節的変動や少子高齢化による社会構造の変化、感染症などの外的要因(BSE対策、新興感染症対策)により供給余力が大きく変化する可能性がある。人工酸素運搬体は長期保存が可能で、血液型に関係なく使用できるため、赤血球製剤の需給を補完できると考えられ、その臨床応用は社会的要請のもとにあると考えられる。平成19年度に臨床応用を目指すHb小胞体(HbV)を用いて得られた研究成果の概要は次のとおりである。

① 小動物のみならず大動物におけるHbVの安全性と有効性の検討は臨床応用に必須の項目であり、ヒトに代謝系が近似するBeagle犬を用いて検討を行なっている。動脈より循環血液量の40%の出血による出血性ショックモデルを作成し、1時間のショック状態を経過した後にHbVを用いて蘇生し、蘇生効果と安全性を確認した後生存させ、1年間の長期生存実験を行った。対照群は脱血血液を蘇生液として用いた。体重の増加は順調で、対照群とほぼ同様な成長を示した。赤血球の容積を表すヘマトクリットは蘇生後14日目には自己血群と同等にまで回復した。白血球は蘇生後やや高値を呈したが、血小板には影響を認めなかった。血液生化学検査では出血性ショックによる各種臓器の虚血再灌流の影響で、AST, ALT, CPKが蘇生後1日目に高値を取ったが自己血群でも同様な高値を推移し、ショックによる影響と考えられた。これらの指標は蘇生3日後には正常に復した。HbVは細網内皮系で補足され、代謝されるので、脾臓の厚さを経時的に超音波検査によって調べたところ、ショック蘇生時には収縮した。ショック蘇生後は動物の安静が保てず、検討できなかった。蘇生後1ヶ月、6ヶ月、1年で動物を犠牲死させ、各種臓器の変化を病理組織学的に検討したが、1カ月後に肝臓の軽度の空胞変性と褐色色素の沈着を認め、脾臓で褐色色素の沈着を認めた。6ヵ月後、1年後にはこの変化は消失し、一過性の変化と考えられた。今後これらの沈着物質の本体を明らかとするとともに、他の動物種での安全性も検討する予定である。

② HbVは大量投与が予想されており、免疫系に与える影響を検討しておくことが重要であると考えられる。昨年度までにラットにHbVを投与すると脾臓のTリンパ球の増殖抑制効果が現れることが報告されたので、本年度はHbVの構成成分のいずれがこの一過性の免疫応答に関与しているかを明らかにするためにHbを内包しない空の小胞体、およびDSPE-PEG₅₀₀₀を欠如させた小胞体、DPPCのみからなる小胞体を使用して免疫応答の変化を検討した。その結果、HbV投与後のT細胞増殖抑制効果は最も単純なDPPC小胞体でも観測された。HbV投与後の脾

臓にHbVを捕捉し、T細胞の増殖を抑制する活性を持つと推定される2種類の細胞集団が同定された。今後これらの細胞集団の機能のより詳細な検討が必要である。

③ 大量に投与されたHbVの代謝過程を検討することは安全性を担保する上で欠かせない。現在まで、正常な動物への投与による代謝過程および体内動態特性を検討・報告してきたが、今回は出血性ショックモデル動物での体内動態特性を明らかとした。その結果、HbVの消失半減期は健常時ラットの30時間から18時間へと短縮し、末梢コンパートメントの分布容積や臓器移行性の有意な増大が確認された。HbVは出血性ショックの蘇生時には臓器末梢にまで広く分布することが明らかとなった。また、この結果をヒトへ外挿したところ、人における同等の出血性ショック時には体内半減期は30時間となると考えられた。

④ 国内外の人工酸素運搬体の研究者と連絡を取り、本研究班の研究進路について検討した。また、HbV投与が血液型検査に与える影響を検討し、自動血液型判定機ではHbVの混入が正確な検査結果をもたらさない場合があることが示唆された。

⑤ 大量投与が予想されるHbVが血液中に分散していると、検査のために採血し、血球成分を除いてもHbVは血漿中に浮遊したままであり、正確な臨床検査を阻んでしまうため、HbVの影響を効率よく除去する方法を開発中である。高分子量デキストラン添加による遠心で効率よくHbVが除去できることが明らかとなっているが、超遠心で除去した血漿との中の検査値を比較し、デキストラン添加分離法の至適化を検討した。その結果、デキストラン添加により一部の生化学、凝固検査で変動をきたすことが明らかとなった（リポプロテイン値の低下傾向、vWF活性の低下傾向、Total PAI-1の上昇傾向）。今後これらの検査を行なう際の標準的な変換式などを検討する必要があると考えられた。

⑥ HbVの投与は膠質液とともに投与されることが考えられており、各種代用血漿製剤に分散させ、更に血液と混合した際のレオロジー特性について検討した。その結果、アルブミン、低分子量Hydroxyl ethyl starch (HES)に分散させると、血液と同等あるいはそれ以下の粘度を呈したが、デキストラン、高分子量HES、修正ゼラチン溶液に分散させると血液より高粘度を呈した。この現象は血液の混合比の増大により是正された。マイクロチャネルによる流動状況の観察では塞栓形成は無く、微小循環での塞栓形成は無いものと考えられた。

⑦ 製造されたHbVを動的光散乱、小角散乱法により粒径の精密な測定を行ったところ、粒径は 238 ± 20 nmと極めて分布が狭く調節されており、被覆脂質膜は一層で、内部Hbの構造と機能には異常が無いことが明らかとなった。

⑧ HbVは血小板の活性化を抑制するために負電荷脂質を用いており、HbV表面の陰性荷電基が関与する静電作用と負電荷脂質分子構造の相関を検討し、補体の活性化を回避するために重要な因子は陰性荷電基の構造であることが明らかとなった。

⑨ マウスの摘出小腸の灌流実験では、HbVが蠕動運動と腸上皮の形態維持に有効であることが明らかにされ、小腸の臓器保存に有効である可能性が示唆された。

⑩ HbVのガスの吸着と放出は物理的な調節を受けていると考えられるが、一酸化窒素(NO)や一酸化炭素(CO)の吸着速度がヘモグロビン溶液と異なることが知られており、小胞体の構造が関与していることが予測されていた。今回、ストップドフロー・ラピッドスキャン分光法からHbVとガス分子の反応様式と反応速度について検討し、小胞体内のガス拡散をシュミ

レーションすることによってその機序を検討した。その結果、脂質膜はガス拡散の障壁にはならず、極めて結合力の強いNOは、小胞体内部の外周側Hb溶液から吸着するため、粒子内部方向へのガス拡散が遅延されるため、吸着速度が遅くなることが明らかとなった。

⑪ HbVが他の人工臓器との間で起こす相互作用を確認するためにラット人工心肺モデル、およびレオメーターを用いた安定性の評価を行ない、HbVが流血中で安定である可能性が示唆された。

⑫ HbVの試料製造を計画通り製造し、製造の安定性を確認した。

⑬ HbVを臨床応用するためには試料のGMP製造が欠かせない。本年度はパイロットプラントに対応したスケールでのHbVの製造を開始した。このスケールでは巨大粒子の生成が認められ、製造の改良を検討している。

これらの結果を受け、平成20年度(3年計画の3年目)は製剤の安全性について先見的学術研究を継続するとともに最終年度として総括を行い、臨床試験に円滑に移行させたい。

分担研究者

池田 久實	北海道赤十字血液センター	所長
小田切 優樹	熊本大学大学院医学薬学研究部 薬物動態制御学	教授
村田 満	慶應義塾大学医学部 中央臨床検査部	教授
高折 益彦	東宝塚さとう病院 (川崎医大 名誉教授)	名誉院長
土田 英俊	早稲田大学 理工学研究所 (早大 名誉教授)	顧問研究員
酒井 宏水	早稲田大学 理工学研究所	准教授
山根 恒彦	㈱オキシジェニクス京都研究所	主任研究員
高野 久輝	ニプロ㈱人工臓器開発センター	センター長
甲斐俊哉	ニプロ㈱医薬品研究所 製剤研究室	室長

A. 研究目的

本研究はHb小胞体(HbV)の臨床応用を円滑に行うために動物実験を通して安全性について把握することが目的である。このため、① 中型動物で出血性ショックの蘇生にHbVを用いて長期生存実験を行い、HbVの安全性と有効性を検証する。② HbVの大量投与に伴う免疫系の変化について昨年度明らかとなった脾臓Tリンパ球の増殖抑制効果についてその機序の解明を行う。③ 健常時に投与したHbVの体内動態についての検討に引き続き、病的状態特に出血性ショック時にHbVを投与した際の体内動態特性を検討する。④ 国内外の人工酸素運搬体の研究者と連絡を取り、本研究班の研究進路を検討する。また血液型判定機へのHbVの干渉作用について検討する。⑤ 大量投与されたHbVが血液中存在すると通常の臨床検査では異常値をきたす項目が数多くあるため、簡便にかつ効率よくHbVを取り除く方法を開発し、高分子量デキストランの投与によるHbVの除去が効率よく行われることを明らかにしたが、本年度はこの方法で影響が出る検査項目を明らかにすることを目的とした。⑥ 膠質液とともに投与されるHbVのレオロジー特性を、各種代用血漿製剤にHbVおよび血液を混和することによって明らかとする。⑦ 製造・調製されたHbVの

詳細な諸元値を明らかにするために、動的光散乱法、小角散乱法を用いて小胞体の形態、脂質膜層数、内包Hbの溶存状況について測定する。⑧ HbVは血小板の活性化の抑制や、相互の凝集の抑制のために負電荷脂質やPEGを用いて小胞体を形成している。補体の活性化を抑制する因子についてHbV表面上の陰性荷電と負電荷脂質の関与について検討する。⑨ HbVが灌流腸管の運動(蠕動)と腸上皮を良好に維持することから、病的状態のHbVの効果について検討するため、灌流腸管の上皮に感染を起こし、その運動と腸上皮への影響について*ex vivo*で評価する。⑩ HbVのガス(NO, CO)の吸脱着特性についてストップフローラピッドスキャン分光法により検討する。⑪ HbVを人工臓器としてとらえた場合の安全性について検討を重ねると同時に、他の人工臓器によるHbVの安定性についてラット人工心肺モデルとレオメーターによるHbVの安定性を検討する。⑫ 厚生労働省科学研究班に供給するHbV試料を計画通り安定的に供給する体系を整備し、計画通りの製造を行う。⑬ パイロットプラントに相当するサイズの製造装置でHbV試料の製造を行い、安定的な製造を目指して改良を行う。

以上の事項を目的とした。

B. 研究方法

上記の研究目的に沿って以下の方法で検討を行った。① 6ヶ月齢の雄性ビーグル犬を用い、40%の脱血ショックモデルを作成、1時間のショックの後、自己血あるいはHbVを用いて蘇生を行う。その後覚醒させ、飼育ケージに戻し、最長1年までの長期観察を行う。経時的に採血を行い、血液生化学的な測定を行うとともに1、3、6、12ヵ月後に犠牲死させ、臓器障害の有無について病理学的な検討を行う。② HbVがラット脾Tリンパ球の増殖抑制を起こすことが明らかとなったので、HbVのどの成分がこの機序に関与しているかを明らかにする目的で、複合素材の分子集合であるHbVから構成分子を取り除いたリポソームを作成して、ラット脾Tリンパ

球の増殖抑制を起こす因子について検討した。③ ラットの出血性ショックモデルを用いて I^{125} -HbVを用いて、HbVの体内動態を検討した。④ 国内外の人工酸素運搬体の研究者と連絡を取り、本研究班の研究の方向性について議論を行い、班会議を通して開発研究を促進をはかった。⑤ デキストランを加えることによりHbVが効率よく除去できる方法が開発されたが、臨床検査成績にデキストランを添加したことがどの程度影響するかについて超遠心によって得られた血清(血漿)と検査値の比較を行う。⑥ 代用血漿製剤であるアルブミン生食、低分子HES、高分子HES、デキストラン、修正ゼラチンの溶液を用いてHbVおよび血液との混合液の粘弾性、凝集について検討する。⑦ 製造されたHbV試料を動的光散乱法および小角散乱法を用いて計測することにより、HbVの膜構造、内部構造、内部状況を明らかとする。⑧ HbVに用いられているカルボン酸型脂質の特性を評価する目的で、ゼータ電位および静電的相互作用モデルを用いて検討し、生体に投与した際の血清補対価について検討した。⑨ マウス摘出腸管を上腸間膜動脈ごと摘出し、HbVで灌流した。Organ chamberで懸垂し、加温したHbV分散液を吻側方向に灌流した。上皮側に細菌感染を起こし、腸管機能との相互反応を解析した。⑩ HbVのガス吸脱着をストップフローラピッドスキャン法にて検討し、シュミレーションを加えたモデルと比較することで、特性を解析した。⑪ ラット人工心肺モデルおよびレオメーターを用いてHbVの安定性を検討するとともに人工臓器としてのHbVの安全性について調査した。⑫ HbV製造プラントを定期的に運転し、安定的な試料の供給を行った。⑬ パイロットプラントに相当するサイズの製造装置でHbV試料の製造を行い、作成試料を検証した。

C. 結果

以上の研究方法により平成19年度には以下の結果が得られた。

① ビーグル犬を用いた長期生存試験では、1年間の生存試験を終了し、すべての血液生化学的な検討、および病理組織学的な検討を行なった。観察期間中の死亡例は無く、HbVを投与した群での体重の増加も自己血輸血群と同等であった。血液検査においてヘマトクリットはHbV投与群において7日後には自己血群と同等の値に復した。生化学検査において1日目はAST、ALT、CPKの一過性の上昇を認めた。いずれも対照群(自己血蘇生群)でも同様の変化を認めた。病理学的検討では一過性に肝、脾に褐色色素沈着を認めた。

② HbVによるラット脾Tリンパ球の増殖抑制は最も単純な形のDPPC小胞体でも観測され、リポソーム特有の現象である可能性が示唆された。また、抑制を誘導する細胞群として2種類の細胞群が同定された。今後はこれらの細胞群の詳細な機能解析が必要と考えられた。

③ 出血性ショックラットへのHbVの投与によりHbVの消失半減期は健常時ラットの30時間から18時間へと短縮し、末梢コンパートメントの分布容積や臓器移行性の有意な増大が確認された。HbVは出血性ショックの蘇生時には臓器末梢にまで広く分布することが明らかとなった。また、この結果をヒトへ外挿したところ、ヒトにおける同等の出血性ショック時には体内半減期は30時間となると考えられた。

④ 米国、中国、ヨーロッパの人工酸素運搬体の研究者と連絡を取り、本研究班の研究進路を検討した。また、HbV投与が血液型検査に与える影響を検討し、自動血液型判定機ではHbVの混入が正確な検査結果をもたらさない場合があることが示唆された。

⑤ 大量投与が予想されるHbVが、高分子量デキストラン添加による遠心で効率よく血漿より除去できることが明らかとなっているが、超遠心で除去した血漿との間の検査値を比較し、デキストラン添加分離法の至的化を検討した。その結果デキストラン添加により一部の生化学、凝固検査で変動

をきたすことが明らかとなった(リポプロテイン値の低下傾向、vWF活性の低下傾向、Total PAI-1の上昇傾向)。今後これらの検査を行なう際の標準的な変換式などを検討する必要があると考えられた。

⑥ レオロジー特性について検討した結果アルブミン、低分子量Hydroxyl ethyl starch (HES)にHbVを分散させると、血液と同等あるいはそれ以下の粘度を呈したが、デキストラン、高分子量HES、修正ゼラチン溶液に分散させると血液より高粘度を呈した。この現象は血液の混合比の増大により是正された。マイクロチャネルによる流動状況の観察では塞栓形成は無く、微小循環での塞栓形成は無いものと考えられた。

⑦ 製造されたHbVを動的光散乱、小角散乱法により粒径の精密な測定を行ったところ、粒径は 238 ± 20 nm、被覆脂質膜は一層で、内部のHbの構造と機能には異常が無いことが明らかとなった。

⑧ HbV表面の陰性荷電基が関与する静電作用と負電荷脂質分子構造の相関を検討し、補体の活性化を回避するために重要な因子は、陰性荷電基の構造であることが明らかとなった。

⑨ マウスの摘出小腸の灌流実験では細菌を感染させると腸管の機能が変化することが観察され、HbVが腸管機能を効率的に温存し、臓器機能の維持に有効であることが示唆された。

⑩ HbVのガスの吸着と放出は物理的な調節を受けていると考えられるが、ストップドフロー・ラピッドスキャン分光法による測定と、小胞体内のガス拡散をシュミレーションすることによって、脂質膜はガス拡散の障壁にはならず、極めて結合力の強いNOは、小胞体内部の外周側Hb溶液から吸着するため、粒子内部方向へのガス拡散が遅延されるため、吸着速度が遅くなることが明らかとなった。

⑪ HbVが他の人工臓器との間で起こす相互作用を確認するためにラット人工心肺モデル、およびレオメーターを用いた安定性の評価を行ない、HbV

が流血中で安定である可能性が示唆された。

⑫ HbVの試料製造を計画通り製造し、製造の安定性を確認した。

⑬ HbVを臨床応用するためには試料のGMP製造が欠かせない。本年度はパイロットプラントに対応したスケールでのHbVの製造を開始した。このスケールでは巨大粒子の生成が認められ、製造の改良を検討している。

D. 考察

以上の検討から、次年度の研究へ結びつく種々の結果が得られた。

まず、① ヒトと代謝系の近似したビーグル犬を用いた長期生存試験では、1年間の生存試験を終了し、すべての血液生化学的な検討、および病理組織学的な検討を行ない、血液と同等の安全性と有効性があると考えられた。蘇生1ヵ月後に認められた肝脾の褐色沈着物について今後の検討が必要と考えられた。

② リポソーム製剤であるHbVの基本骨格によりラット脾Tリンパ球の増殖が抑制されたことが明らかとなり、抑制に関与する細胞集団が同定されたので、今後この細胞集団の機能解析を行ない、HbV投与がより安全に行える方法を検討する必要があると考えられた。

③ 出血性ショックラットへのHbVの投与によりHbVの消失半減期が18時間へと短縮し、末梢コンパートメントの分布容積や臓器移行性の有意な増大が確認された。HbVが出血性ショック時でも末梢臓器に分布し、機能していることが示され、蘇生液としての能力が十分あることが示唆された。また、ヒトへの咳嗽によりショック時でも30時間の血中半減期があると予測されたことは臨床応用に期待できる結果である。

④ 米国、中国、ヨーロッパの人工酸素運搬体の研究者との討議により研究進路としてはHbVの安定性を担保する方法を検討すべきとされた。また、自動血液型判定機の使用には注意が必要であると

考えられた。

⑤ 高分子量デキストラン添加により一部の生化学、凝固検査で変動をきたすことが明らかとなり、今後これらの検査を行なう際の標準的な変換式などを検討する必要があると考えられた。

⑥ HbVをどの膠質液に分散させて投与すると生体に最も適合性がよいかを*in vitro*で検討し、それぞれの特性について明らかにされたが、凝集や、粘度が著しく変化する膠質液はなく、HbVを分散させる膠質液には多種類のものが使用できると考えられた。マイクロチャネルによる検討でも同様であった。

⑦ 製造されたHbVの物理的な諸元は驚くほど正確に調整されており、機能的な形態を保っていることが明らかとなった。

⑧ 補体の活性化を回避するために重要な因子は陰性荷電基の構造であることが明らかとなり、HbVに使用されているカルボン酸型の陰性荷電基が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

⑨ マウスの摘出小腸の灌流実験では細菌を感染させると腸管の機能が変化することが観察され、HbVが腸管機能を効率的に温存し、臓器機能の維持に有効であることが示唆された。

⑩ HbVのガスの吸着と放出に関して脂質膜はガス拡散の障壁にはならず、小胞体内の高濃度のHb溶液が緩やかにガスと反応することによりガス分子の吸脱着の速度が決定されていることが明らかとなり、赤血球に近い挙動が生理的な反応をもたらすものと考えられた。

⑪ ラット人工心肺モデル、およびレオメーターを用いた安定性の評価の結果、HbVが流血中で人工臓器との相互作用が少なく、安定である可能性が示唆された。

⑫ HbVの試料製造を計画通り製造し、製造の安定性を確認した。

⑬ パイロットプラントに対応したスケールでのHbVの製造を開始したことによりHbVの臨床応用

への予定が進行していると考えられた。

E. 結論

HbVの臨床応用を目標とした種々の安全性の検討、および臨床応用の際に問題となるであろう、検査項目の選定と正確な評価などについて重要な検討がなされた。

ビーグルの長期生存の結果、安全性が確かなものであると判定できた。免疫応答の機序の検索では、HbV投与後に一過性に免疫応答が抑制されることのメカニズムについて検討が行われ、Tリンパ球の増殖抑制に働く細胞集団の同定が行われた。

病的状態の動物での体内動態が明らかとなり、半減期は短くなるもののショック状態でもHbVが十分機能していることが示唆された。

国内外の研究者からの意見を集約し、HbV開発研究の方向性が明らかとなった。

また、臨床応用時に必要な臨床検査の正確な評価には特定の項目で測定値を正確に評価する変換式を必要とする可能性が示唆され、検討の継続が必要である。

ラット腸管を用いた灌流実験では、腸管の機能と構造の維持が可能で、病的状態の評価にも耐えることから、臓器保存液としての可能性が示唆された。

HbVのガスの吸脱着に関する検討ではHbVが赤血球に近いガス特性を保持していることが明らかとなり、血液中での生理的な反応を理解する上で重要な発見であった。

人工臓器との適合生については今後も検討を重ねるべき項目であると考えられた。

HbV製造に関しては均質な資料の製造が安定した。また、臨床試験に向けたパイロットプラントでの製造が速やかに安定することが望まれる。

これらの結果を受け、平成20年度(3年計画の3年目)は製剤の安全性について先見的学術研究を継続するとともに最終年度として総括を行い、臨床試験に円滑に移行させたい。

分担研究報告書

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

分担課題：Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生および中長期生存の評価

主任研究者 小林 紘一 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 教授
研究協力者 堀之内宏久 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 準教授
池田 達彦 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助手

研究要旨

以前よりHb小胞体の臨床応用を考えた場合の安全性と効果を検証するため、ビーグル犬を用いて50%出血ショックモデルを作成し、蘇生にHb小胞体分散液を用いて実験を行ってきた。蘇生液としてHb小胞体を5%アルブミン生食に分散した液体(Hb小胞体分散液)、アルブミン生食、および脱血血液を用いて蘇生を行い、蘇生効果、安全性について検証し、Hb小胞体分散液はアルブミン生食、脱血血液と同様の蘇生効果があることが示された。今回は中長期の安全性の評価のため、40%出血モデルを作成し、蘇生にHb小胞体分散液、脱血血液を用いて実験を行った。血液学、血液生化学また病理組織学的検討を行った。Hb小胞体分散液は脱血血液と同等の蘇生効果を示し、安全性も同等であることが確認された。

A. 研究目的

Hb小胞体の臨床応用において安全性の評価は酸素運搬能と同様に静脈内投与されて効率よく酸素運搬を行い、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。物質の製造は大学の研究室レベルでは大量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を確保することが難しかった。平成16年度試料を外部の研究機関に委託製造し、GLPレベルの均質なHb小胞体を比較的大量に製造し供給できる体制が整い、中型動物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、中長期の安全性の評価を行うことを目的とした。

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。

右大腿動脈に動脈圧モニター用、および脱血用のカテーテルを挿入した。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。大脳皮質、腹直筋の組織血流内酸素飽和度をNIRA法(Somanetics製、SPFB)により連続測定、記録した。

計測のための機器を装着し、状態が安定化した後に体重から次式(循環血液量(ml))=86(ml/kg)×体重(kg)を用いて求めた循環血液量の40%相当量を20 ml/minの速度で脱血した。

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

脱血ショック状態を1時間継続した後、脱血血液 (Autologus shed blood, ASB群)、Hb小胞体分散液 (Hb小胞体を5%アルブミン生食に分散した液体。Hb濃度は8.6 g/dl : Hb小胞体群) 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。蘇生液投与後4時間、全身麻酔下に循環動態を確認した後に半覚醒の状態とし、自室へ戻した。以後1、3、7、14、28、56、84、168、365日目に体重、CBC、血液生化学を測

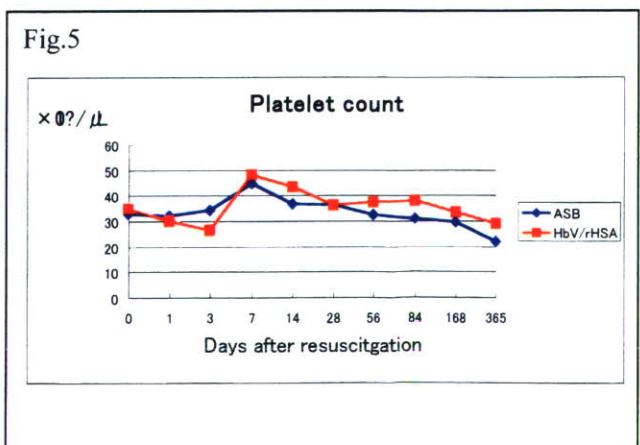
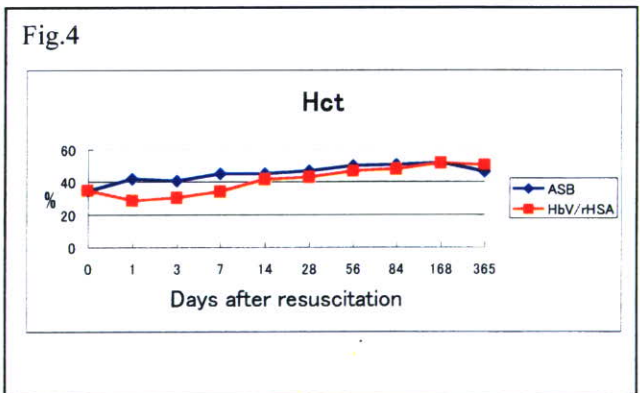
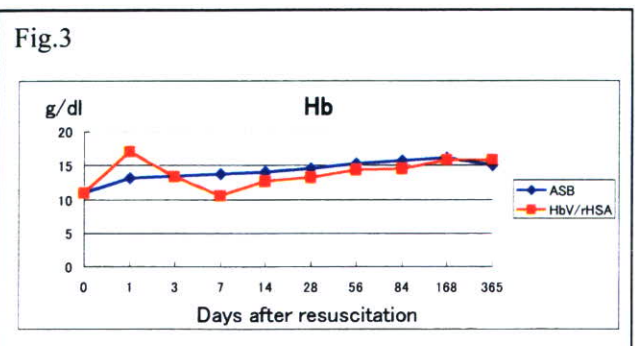
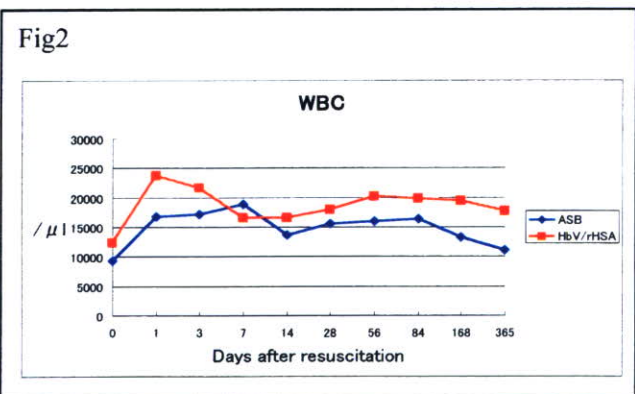
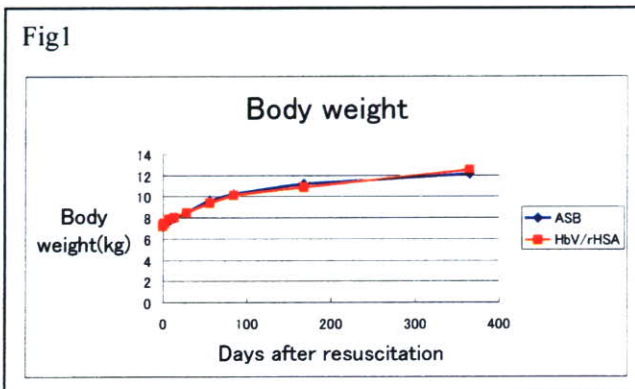
定した。また28日目、168日目または365日目に犠牲死させ病理組織学的所見を検討した。また脱血前から蘇生液投与後4時間の間は血圧、心拍数、動脈血血液ガスを測定し循環動態の観察を行った。

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とされる。脾臓の収縮の確認のため蘇生前後に経皮的に超音波にて脾臓のサイズを測定した。

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

自己血群は n=7 (365 days: n=3, 168 days: n=2, 28 days: n=2) で、HbV 群が n=9 (365 days: n=3, 168 days: n=3, 28 days: n=3) である。



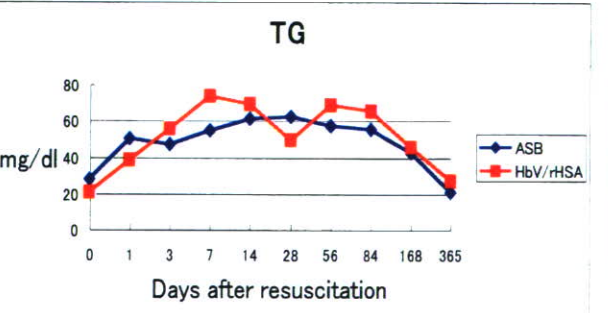
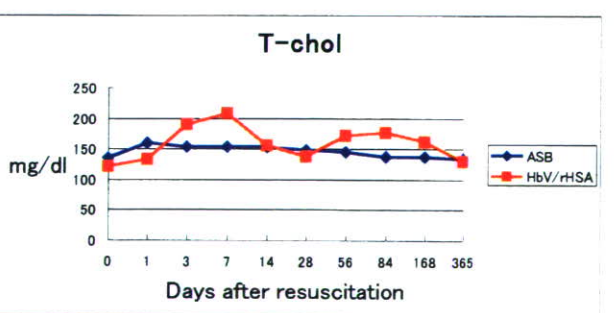
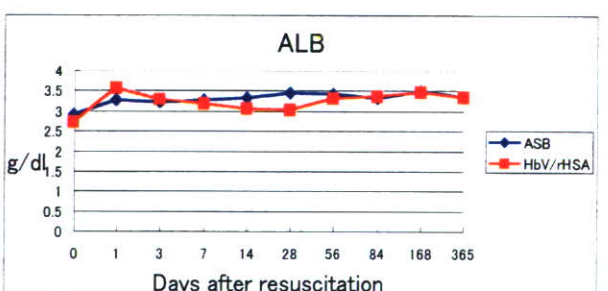
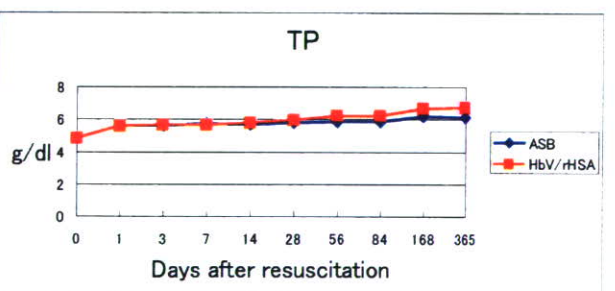
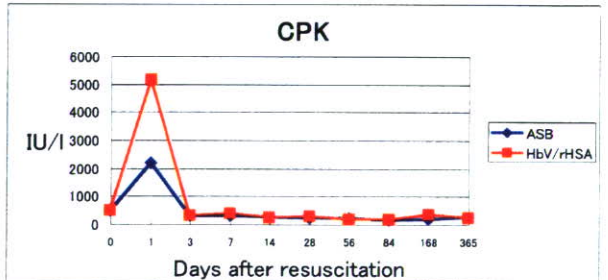
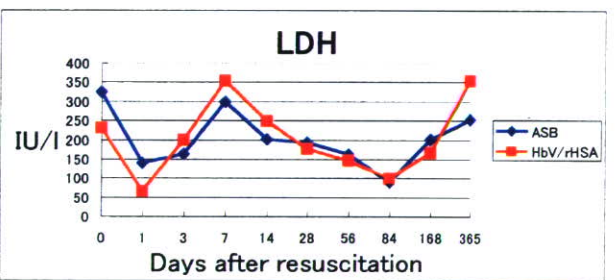
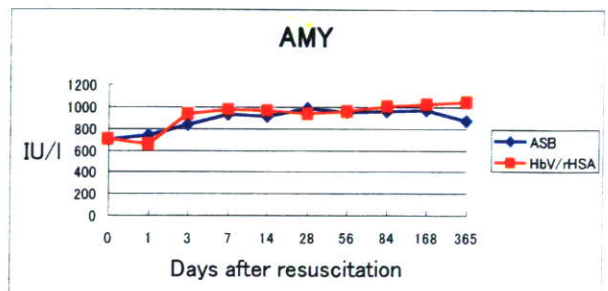
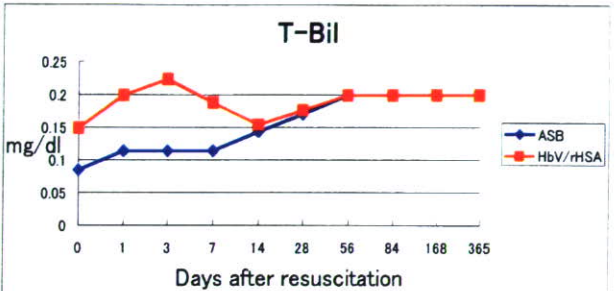
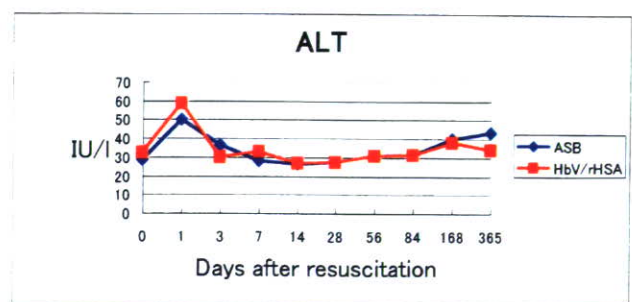
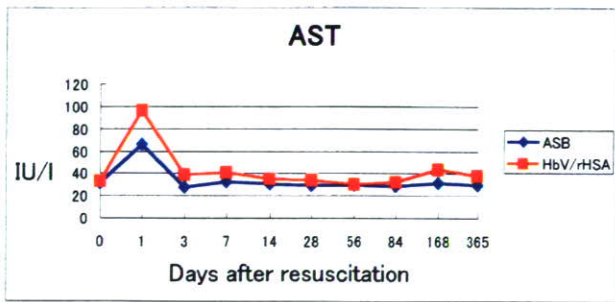


Fig.6

体重の変化 (Fig.1)

図のように両群とも同様の経過が認められた。

WBC, Hb, Hct, Plt の変化 (Figs. 2, 3, 4, 5)

WBC においては両群とも同様の経過を認めた。Hb では HbV 群において Day1 に上昇したが自動血球計測装置を用いたための誤差と考えられた。その後は自己血群と同等な値に復した。Plt においては両群とも同様の経過を示した。

血液生化学所見の変化 (Fig. 6)

AST, ALT においては Day1 に出血性ショックの影響で一過性に上昇認めたがその後は脱血前の値に復した。T-Bil は HbV 群において Day1 から Day7 まで上昇を認めたがその後は同様な経過を示した。AMY は上昇傾向だったものの両群とも同様な経過を示した。LDH は Day7 にショックの影響と考えられる一過性的上昇を認めた。その後は同様の経過を示した。CPK は Day1 に出血性ショックの影響で一時的に上昇認めたがその後は脱血前の値に復した。TP, Alb は両群ともに低下認めなかった。T-Chol, TG とも HbV 群でやや高値を示したがほぼ同様の経過を示した。

脾臓サイズの変化 (Fig. 7)

左肋骨弓下より超音波にて脾臓を確認し、脾門部から下縁までの距離を超音波で計測した。脱血により脾臓は収縮することが確認された。脱血、蘇生前後で両群ともほぼ同様の経過を示した。

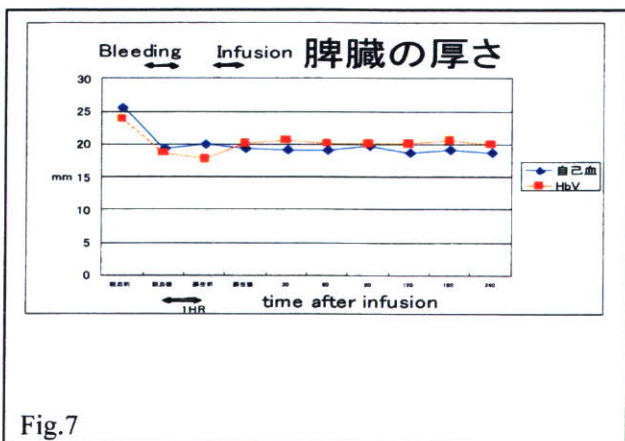


Fig.7

病理組織所見 (Table 1)

HbV/rHSA 群にて肝臓で Day28 に空胞変性と褐色色素沈着を認めた。脾臓で Day28 に褐色色素沈着を認めた。いずれも 168Days、365Days のモデルでは認めず、一過性的変化と考えられた。

Table 1. Histopathological examination of organs.

Organ findings	ASB	HbV/rHSA
Cardiovascular		
Heart	NR	NR
Aorta	NR	NR
Urinary system		
Kidney		
Tubule, basophilic body	--~±	-
Lymphocyte infiltration	--~+	--~+
Brown pigment deposition	---~+	-
Testis		
Atrophy, (seminiferous tubule)	--~±	-
Endocrine		
Adrenal gland	NR	NR
Digestive system		
Liver		
Cellular (infiltration, mononuclear cell)	--~+	-
Vacuolar formation	-	+(Day28)
Brown pigment deposition	-	+(Day28)
Esophagus and small intestine	NR	NR
Large intestine	NR	NR
Pancreas	NR	NR
Respiratory system		
Trachea	NR	NR
Lung		
pneumonia	-	--~+
Hematopoietic system		
Mesenteric lymph node	NR	NR
Thymus		
Atrophy	-	-
Spleen		
Hemorrhage, capsule	--~+	-
Brown pigment deposition	-	+(Day28)

D. 結論

Hb 小胞体を用いた脱血ショックモデルでの検討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。

一昨年度はビーグル犬を用いて脱血ショックモ

デルを作成し、Hb 小胞体 の急性期の有効性と安全性を検討した。今回は中長期での安全性の確認のため、40%脱血ショックモデルを作成し長期生存をさせ、その経過観察中に全身状態、血液、血液生化学的検査を行い、比較検討した。また病理組織学的所見も検討した。いずれの所見においても HbV/rHSA 群は ASB 群とほぼ同様の経過を示した。長期生存モデルにおいても HbV は自己血と同様の安全性と有効性があるものと考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. H. Komatsu, T. Furuya, N. Sato, K. Ohta, A. Matsuura, T. Ohmura, S. Takagi, M. Matsuura, M. Yamashita, M. Itoda, J. Itoh, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Effect of hemoglobin vesicle, a cellular-type artificial oxygen carrier, on middle cerebral artery occlusion- and arachidonic acid-induced stroke models in rats. *Neurosci. Lett.* 421, 121-125 (2007).
2. 高折益彦、堀之内宏久、小林絃一. 救急医療の現場での輸血医療の実態と人工酸素運搬体への期待. *救急医学* 31, 981-986 (2007).
3. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. One-year observation of Wistar rats after infusion of Hb-vesicles (Artificial oxygen carriers). *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* 35, 81-91 (2007).
4. T. Komatsu, Y. Huang, S. Wakamoto, H. Abe, M. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Influence of O₂-carrying plasma hemoprotein "albumin- heme" on complement system and platelet activation in vitro and physiological responses to exchange transfusion. *J. Biomed. Mater. Res. 81A*, 821-826 (2007).
5. M. Yamamoto, Y. Izumi, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, M. Kohno, M. Watanabe, T. Adachi, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Systemic administration of hemoglobin vesicles elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J. Surg. Res.* (in press).
6. H. Sakai, A. Sato, P. Sobolewski, S. Takeoka, J.A. Frangos, K. Kobayashi, M. Intaglietta, E. Tsuchida. NO and CO binding profiles of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Biochim. Biophys. Acta (Proteins & Proteomics)* (in press).
7. H. Kuroda, M. Kawamura, T. Hato, K. Kamiya, M. Kawakubo, Y. Izumi, M. Watanabe, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone after chemotherapy with vinorelbine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (in press)
8. H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Histopathological changes of rat brain after direct injection of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. *J. Biomed. Materials Res. Part A* (submitted).
9. H. Sakai, Y. Seishi, Y. Obata, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Fluid Resuscitation with Artificial Oxygen Carriers in Hemorrhaged Rats: Profiles of Hb-vesicles Degradation and Hematopoiesis for 14 days. *Shock.* (submitted)

(総説、著書など)

1. 酒井宏水、堀之内宏久、山本学、池田 栄二、武岡真司、高折益彦、土田英俊、小林絃一 / ヘモグロビン小胞体(HbV)-リコンビナントアルブミン分散溶液による40%交換輸血:ラット脾臓内HbV代謝と造血に関する2週間の観察 (論文記事、Secondary Publication). *日本輸血細胞治療学会誌* 53, 47-55 (2007)
2. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen

- carriers: Present situation and future vision. *J. Intern. Med.* 263, 4-15 (2008).
3. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers (Review paper). *Artif. Organs* (submitted)
2. 学会発表
1. M. Anraku, T. Kai, K. Taguchi, Y. Urata, E. Tsuchida, K. Kobayashi, M. Otagiri / Pharmacokinetic properties of hemoglobin-vesicles developed as a red blood cell substitutes / Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) 2007 / 2007. 4. 22-25 / Amsterdam
2. 宮川賀仁、酒井宏水、佐藤 敦、堀之内宏久、武岡真司、高折益彦、小林絃一、土田英俊／人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)と各種代用血漿剤の併用によるラット血液交換試験／第56回高分子学会年次大会／2007.5.29-31／京都国際会議場
3. 酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊／人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)による50%出血性ショック蘇生後の回復過程／第56回高分子学会年次大会／2007.5.29-31／京都国際会議場
4. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Fluid resuscitation with Hemoglobin-vesicles (Artificial Red Cells) in hemorrhaged rats and profiles of recovery for 14 days. / 53rd Annual Conference of ASAIO / 2007. 6.7-9 / Chicago, USA.
5. 小林絃一／人工血液の将来展望／第14回日本血液代替物学会 年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス
6. 酒井宏水、佐藤敦、宮川賀仁、武岡真司、堀之内宏久、高折益彦、小林絃一、土田英俊／ヘモグロビン小胞体と各種代用血漿剤の併用に関する検討／第14回日本血液代替物学会 年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス
7. 田口和明、浦田由紀乃、安楽誠、甲斐俊哉、岩尾康範、土田英俊、小林絃一、小田切優樹／出血性ショック時におけるヘモグロビン小胞体の体内動態特性／第14回日本血液代替物学会 年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス
8. 須崎裕典、酒井宏水、小林直樹、池田達彦、堀之内宏久、小林絃一、武田朴、戸川達男、土田英俊／ヘモグロビン小胞体に対応できる多波長パルス分光法を用いたパルスオキシメータ／第14回日本血液代替物学会 年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス
9. 池田達彦、堀之内宏久、井澤菜緒子、河野光智、泉陽太郎、渡辺真純、川村雅文、宗慶太郎、酒井宏水、土田英俊、小林絃一／Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存の評価／第14回日本血液代替物学会 年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス
10. 河野光智、堀之内宏久、泉陽太郎、酒井宏水、土田英俊、小林絃一／ヘモグロビン小胞体の炎症性腸疾患治療への応用／第14回日本血液代替物学会 年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス
11. K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, T. Kai, Y. Iwao, K. Kobayashi, E. Tsuchida, M. Otagiri. / Possible utility of hemoglobin-vesicle for blood cell substitution pharmacokinetic properties in hemorrhagic shock rat model. / The 8th International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) / Oct. 8-12, 2007 / Sendai International Center
12. K. Kobayashi / Possible clinical use of hemoglobin vesicle (HbV)-cellular type artificial oxygen carrier / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
13. H. Sakai, A. Sato, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Hemoglobin vesicles as artificial oxygen carriers: Interactions with ligand molecules in the production process and in blood circulation. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.

14. H. Horinouchi, N. Aikawa, M. Kohno, Y. Izumi, H. Sakai, K. Sou, T. Komatsu, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Change of cytokine production in intra-abdominal hemorrhage model. –Effect of hemoglobin-vesicles. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
15. T. Ikeda, H. Horinouchi, M. Kohno, Y. Izumi, M. Watanabe, H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Resuscitation effect and long term effect of Hb vesicles on organ function in beagle dog. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
16. M. Kohno, H. Horinouchi, Y. Izumi, T. Ikeda, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Application of hemoglobin vesicles to anemia due to inflammatory bowel disease in a mouse model. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
17. Y. Izumi, T. Yamada, E.N. Ogawa, H. Morisaki, H. Sakai, H. Horinouchi, J. Takeda, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Administration of hemoglobin vesicle under mechanical ventilation does not affect lung function. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
18. H. Suzaki, H. Sakai, N. Kobayashi, T. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, S. Takeda, T. Togawa, E. Tsuchida. / Multiwavelength pulse spectrophotometry applicable for hemoglobin-vesicles. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
19. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Fluid resuscitation with Hb-vesicles in hemorrhaged rats and profiles of recovery for 14 days. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
20. P. Bercik, H. Sakai, J. Lu, K. Kobayashi, E. Tsuchida, S.M. Collins. / Intestinal barrier function is preserved using Hb vesicle (HbV) in a model of isolated arterially perfused murine intestine. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
21. 富田裕、鳥海春樹、長田高志、富田稔、畝川美悠紀、酒井宏水、土田英俊、堀之内宏之、小林紘一、鈴木則宏／マウス脳梗塞モデルへの人工赤血球投与の試み／第19回 日本脳循環代謝学会総会／2007. 10.25-26／盛岡
22. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Hb-vesicles as artificial oxygen carriers: Interactions with ligand molecules in the production process and in blood circulation. / 2007 Joint Congress of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (JSAO) and The 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFAO) / October 28-31, 2007 / Osaka
23. H. Horinouchi, T. Ikeda, N. Izawa, H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida, K. Kobayashi, E. / Long term survival study after resuscitation of hemorrhagic shock model in beagle dog: Hb-vesicles has an equal potentiality for resuscitation compared to the autologous blood. / 2007 Joint Congress of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (JSAO) and The 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFAO) / October 28-31, 2007 / Osaka
24. 小林 紘一／人工赤血球の臨床応用に当たっての問題点と対策・開発現況／平成19年度研究成果発表会「人工血液をつくる(8)」／2008.2.11／慶應義塾大学医学部北里講堂
- G. 知的財産権の出願、登録状況（予定を含む）
該当なし

分担課題： Hb小胞体の免疫系への影響に関する検討

分担研究者	池田 久實	北海道赤十字血液センター	所長
	東 寛	北海道赤十字血液センター	研究部長
	藤原 満博	北海道赤十字血液センター	
	高橋 大輔	北海道赤十字血液センター	

研究要旨

ポリエチレングリコールで表面を修飾したHb小胞体(HbV)をラットに投与した後、一過性に認められる脾T細胞増殖抑制の機序について検討した。T細胞増殖抑制効果は、HbVの主要な脂質膜成分であるDPPCが単独で形成する小胞体の投与後にも誘導された。HbV投与後の脾臓に、投与したHbVを捕捉しT細胞の増殖を抑制する活性をもつと推定される二種類の細胞集団が同定された。一つはclassII+CD3-CD4^{low}のフェノタイプを持ち、形態学的にはマクロファージ様の細胞集団であり、もう一つはClassII-CD3+CD4^{low}のフェノタイプを持ち、形態学的には骨髓球と類似の細胞集団である。今後、これらの細胞集団と抑制効果との関連等についてより詳細に検討する必要がある。

A. 研究目的

我々は、HbVのラット免疫応答への影響を検討した一連の実験から、HbV投与後に脾T細胞のCon A 刺激による増殖反応が一過性に低下すること、およびその際に脾臓においてT細胞の増殖反応を抑制する細胞が存在している可能性を見出してきた。本研究はHbVを構成している成分の何れがこの一過性の免疫応答の低下に関与しているのか、また免疫応答を抑制している細胞集団を明らかにすることを目的としている。

B. 実験方法

1. Con A刺激に対するラット脾T細胞の増殖反応の検討

実験にはWKAHラット(♂, 9-12週齢, 体重約280-330 g)を用いた。ラットに循環血液量の20%

(v/v)に相当するHbV溶液(約3.3-4.6 mL) (脂質含量として約(6g/dl)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。HbVの構成成分は、ヒトHb溶液およびこれを内包する混合脂質膜成分として、DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin) と cholesterolを主要成分とし、更に脂質膜表面を修飾するためのpolyethylene glycol (PEG)と結合する脂質としてDPSE-PEG₅₀₀₀ (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-PEG₅₀₀₀) および、負電荷脂質DHS (1,2-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate)が使用されている。故にHbVはHb/DHS/Cholesterol/DPPC/PEG-DSPEから構成されていると言える。実験にはHbVの他に、HbVとほぼ同量の脂質含量となる様に調節したHbを内包していない空リポソーム (liposome 1)、HbとPEG修飾のないリポ

ソーム (DPPC+cholesterol, liposome 2)、および Hb/DHSG/PEG 修飾/cholesterol のない DPPC のみからなるリポソーム (liposome 3) を用いた (Table 1 参照)。また脂質のコントロールとして市販の輸液乳剤である Intralipid (テルモ社製、トリグリセリド) を投与した。投与後およそ 16 時間後にエーテル麻酔で犠牲死し、無菌的に脾臓を摘出した。培養液 (RPMI 1640 / 10% FCS / 50 μ l 2-mercaptoethanol (2-ME)) 5 mL に浸した脾臓をディッシュ中ですりつぶし、その懸濁液を遠心チューブに移して静置することにより、大きな組織塊を沈降させた。上清を 2,000 rpm \times 5 min 遠心し、沈殿した細胞を RPMI1640 で洗浄した後、塩化アンモニウム-トリス緩衝液 (IBL 免疫生物研究所) 5 mL にて 3-5 分間溶

血処理をした。溶血処理細胞液に 5 ml の培地 RPMI/FCS/2-ME を加えた後、遠心、洗浄を行い、最後に培養液に懸濁して脾細胞とした。この脾細胞を丸底 96 穴プレートに triplicate で分注 (2×10^5 個 / 200 μ L / ウェル) し、Con A (終濃度 0.3, 3 μ g/ml) を加え、37°C, 5% CO₂ にて培養を開始した。培養 72 時間後に各ウェルに 18.5 kBq の ³H-デオキシチミジン (アマシヤム) 10 μ L を添加し、その 24 時間後にセルハーベスターにて細胞を回収した。細胞 DNA に取り込まれた ³H-デオキシチミジン量を液体シンチレーションカウンタにて測定した (Fig. 1)。

2. 組織学的検討

摘出した脾臓はすりつぶす前に、予め概観、湿

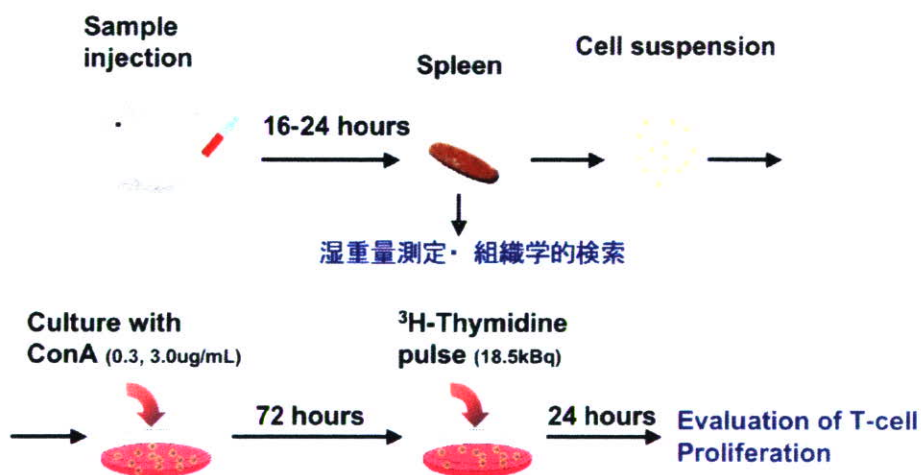


Fig. 1. Experimental protocol for evaluation of the effect of liposome on Con A stimulated T cell proliferation

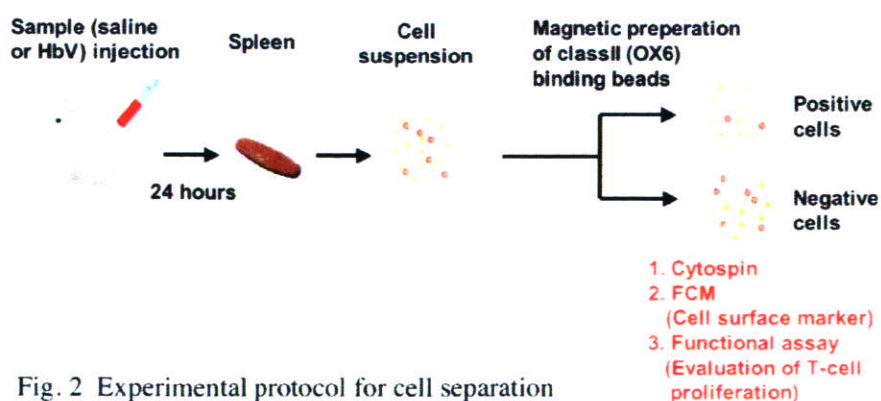


Fig. 2 Experimental protocol for cell separation

重量を測定した。一部はホルマリン固定後にHE染色を施し、病理組織学的な変化を解析した。

3. T細胞の増殖反応を抑制するサブセットの解析

HbV投与後に脾細胞中に現れると考えられるT細胞の増殖反応を抑制する細胞群を同定するため、HbVを投与したラット脾細胞をHLA class II抗原に対する単クローン抗体を固相化したbead、anti-MHC classII(OX-6) microbeads, MACS (Miltenyi Biotech, Bergisch, Gladbach, Germany)を用いて、2群に分け、それぞれを生食投与ラット由来の脾細胞に加え（後者1に対して、前者を0, 0.2, および1の割合で加えた）、Con A刺激に対する増殖反応を検

討した。また、分離したサブセットについては、フローサイトメーターを用いてCD3抗体とCD4抗体による2 color解析を行い、表面マーカーの詳細な解析を行った。さらに分離した二つのサブセットをサイトスピンにかけたのち、May-Grünwald-Giemsa染色を施し形態学的な観察を光学顕微鏡にて行った(Fig. 2)。

C. 実験結果

1. リポソーム投与後の脾臓の重量変化

脾臓は、肉眼的にもHbVおよびliposome 1-3投与後に肥大しており (Fig. 3)、重量の計測によってもそのことが確認された(Fig. 4)。また、組織学的に

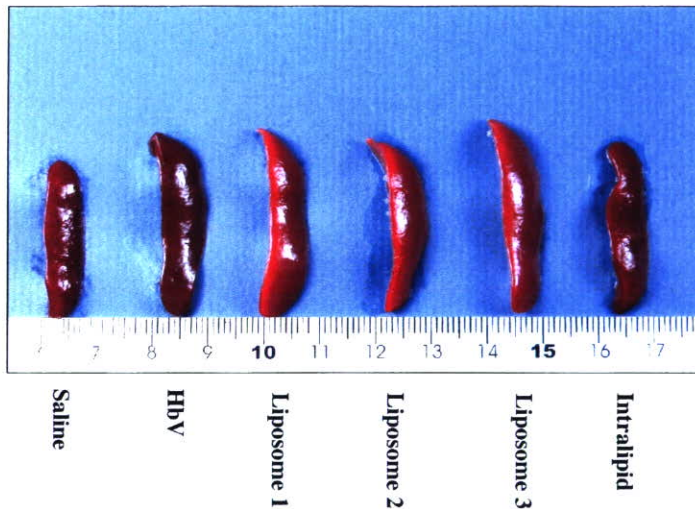


Fig. 3. Macroscopic change of spleen size

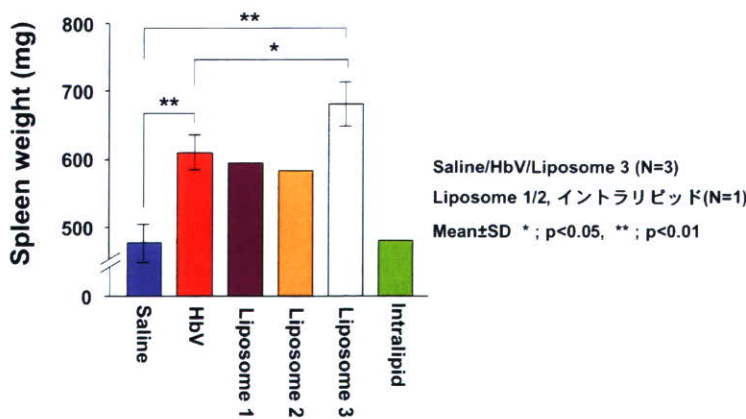


Fig. 4 Weight of spleen
The spleen increased in weight after injection of liposome, but saline or Intralipid.

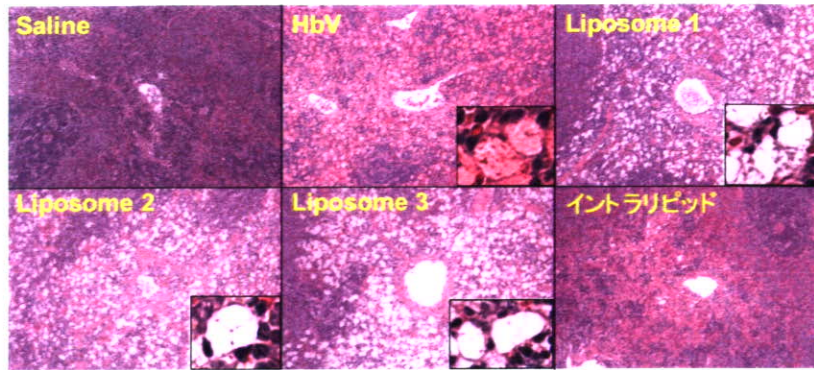


Fig. 5. Microscopic examination of spleen taken after the injection of liposome. In the case of spleen loaded by HbV and liposome, the enlargement of cytoplasmic area was clearly observed.

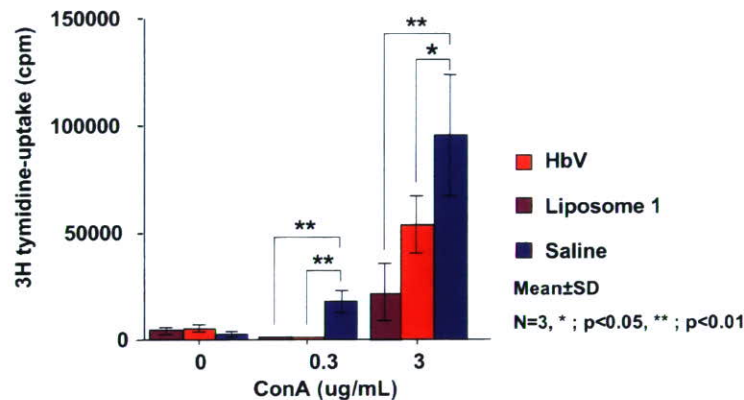


Fig. 6. The effect of HbV and liposome 1 on the proliferation of Con A stimulated splenic T cells. The injection of both HbV and liposome 1 affect the proliferation of splenic T cells

も細胞質の肥大した細胞がmarginal zone(赤脾髄)に認められた(Fig. 5)。

2. 各種リポソーム投与後の脾T細胞の増殖反応への影響

HbVだけではなく、liposome 1, 2, 3何れの投与でも脾T細胞の増殖反応は抑制されていることが判明した(Figs. 6, 7, 8)。コントロールの一つとして選択したIntralipidには抑制効果は認められなかった。これらの結果をTable 1にまとめた。DPPCからなるリポソームだけでも、投与後に脾臓に集積し、T細胞の増殖反応の抑制が認められることが明らかとなった。

3. T細胞の増殖を抑制する細胞群の同定

3.1. 組織学的解析

HbV投与後の脾細胞をclass II抗原の発現の有無で二つのサブセットに分け、May-Grünwald-Giemsa染色を行った(Fig. 9)。Class II陽性サブセットはリンパ球様の細胞(Bリンパ球と形質細胞と推定される)と大型のマクロファージ様の細胞がみとめられた。後者はHbVを捕捉しているように見える。一方、class II陰性サブセットでは胞体の少ない小リンパ球様細胞(主としてTリンパ球と推定される)と楕円形の偏在する核と豊富な細胞質をもった骨髓球様の細胞が認められた。後者もHbVを捕捉しているように見える。