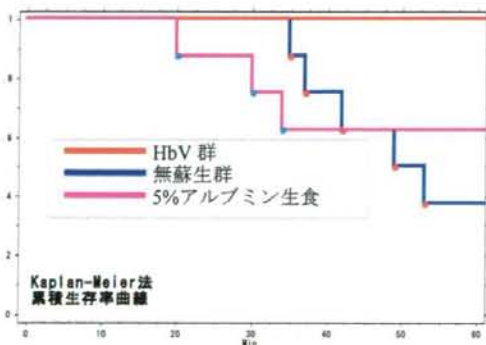




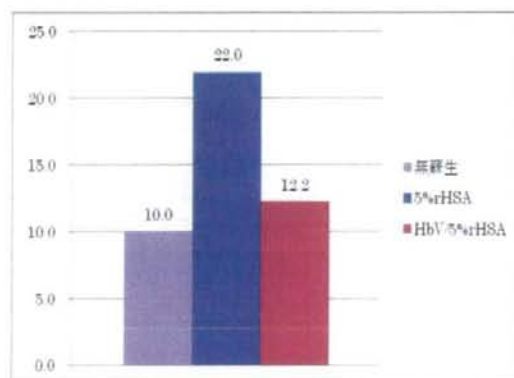
Fig. 2. 実験終了時の腎損傷の形態。腎破裂に近似の解消が惹起されていることが分かる。

C. 結果

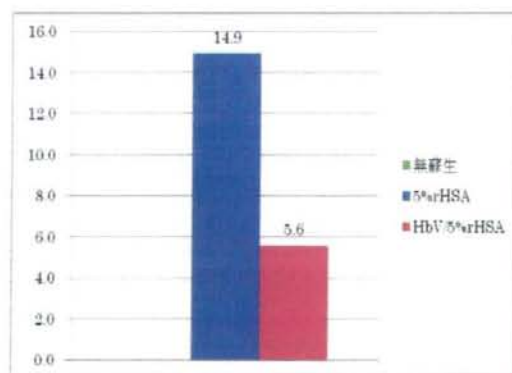
生存率について、腎破裂による制御不能出血では無蘇生群、アルブミン生食群でそれぞれ60分後の生存率がそれぞれ37.5%、62.5%であったが、HbV群では死亡した個体はなく、生存率は100%であった。各群間には有意差はないが、HbV群は無蘇生群、5%アルブミン生食群に比して生存率が良好である傾向があった。(p=0.057)



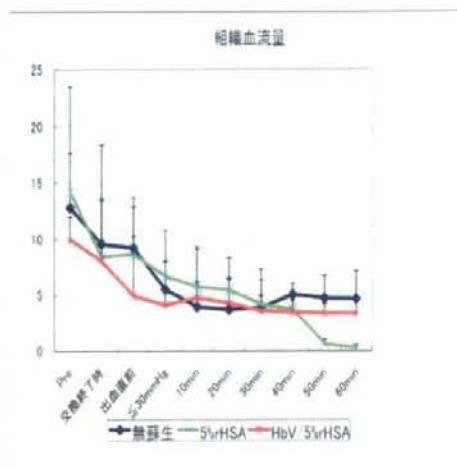
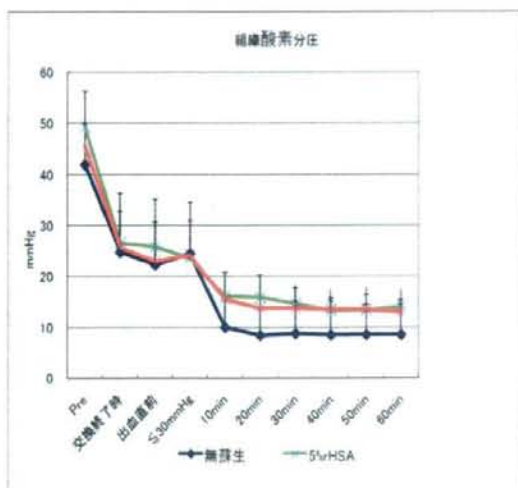
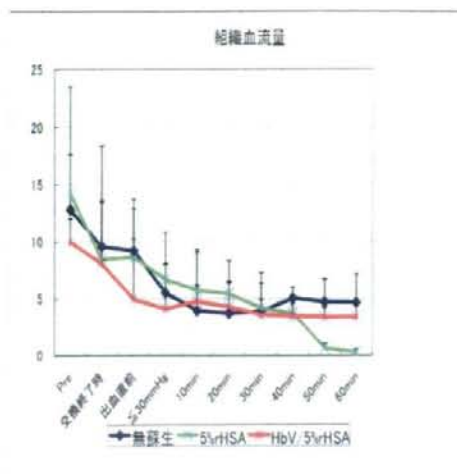
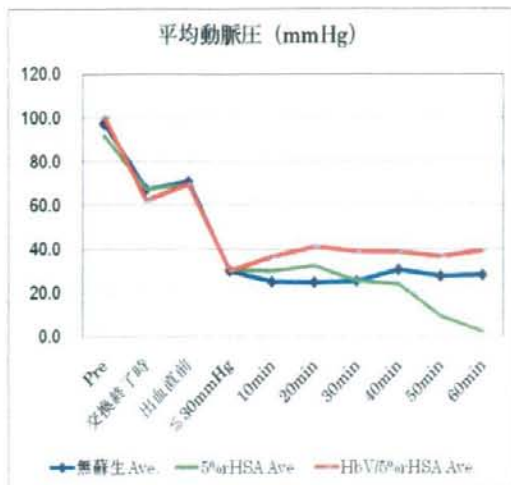
出血量について、60分後に生存している動物は回復し、腹腔内の出血量を測定し、犠牲死させた。出血量は無蘇生群で 10 ± 2.3 ml、5%アルブミン生食群で 22.0 ± 3.5 ml、HbV群で $12.2 \text{ml} \pm 7.5$ mlで無蘇生群とアルブミン生食群、無蘇生群とHbV群との間に有意差を認めた。



腎破裂作成後に血圧が30mmHgに低下した時点で輸液組成を開始したが、血圧を35mmHgから45mmHgの間に維持するために必要であった輸液量は5%アルブミン生食群では 14.9 ± 2.9 ml、HbV群では 5.6 ± 6.4 mlであり、両者の間に有意差を認めた。



平均動脈圧は5%アルブミン生食群で輸液組成を続けているにもかかわらず低下した。無蘇生群およびHbV群では血圧を維持することができていた。



皮下組織酸素分圧は一樣に低下したが輸液組成を行っている群（5%アルブミン生食群、HbV群）で良好である傾向があった。

腹直筋での血流量は正常時の50%以下にまで落ち込んだ。そして5%アルブミン生食群では血圧を維持するために輸液の投与が大量となったが、組織血流量は減少した。

血中乳酸値は上昇を続けたが、蘇生群では症状が抑制され、特にHbV群では生食群に比し、有意に低値であった。

D. 考察

鈍的外傷では腹腔内あるいは胸腔内の出血による出血性ショックが病態を重篤にさせる因子の一つである。救急医療施設では、出血の制御と輸液による蘇生を同時に行うことで治療目的を達することができるが、受傷現場あるいは搬送中は止血操作が十分に行えないため、救急施設へ到着するまでの効果的な治療についてはまだ検討の余地がある。特に、欧米で確立されている受傷現場より救急施設までの間を晶質液による輸液で血圧を維持する様式で治療を行なった場合、出血量が多くなり、予後が不良となる可能性が大きいことが発

表されるようになってより、初期輸液蘇生に関しての多くの検討がなされるようになってきた。今回われわれは、鈍的腎破裂による制御不能の腹腔内出血を起こすラットモデルを開発し、輸液蘇生による生存、組織酸素代謝について検討した。当初ナイーブな動物を用いた腎破裂モデルでの検討を行なったところ、腹腔内で容易に止血されていた。このため、ヘパリン化して検討を行なったところ、制御不能の出血を惹起することが可能となった。しかし、ヘパリン化ではヘパリンによる凝固抑制状態が組織酸素代謝に影響する可能性があったため、臨床的な病態とかけ離れるのではないかと考えた。そこで、Hydroxyethyl starch (HES)を用いて血液希釈を行い、その後に同様の腎破裂を作成した。HESの量を予測循環血液量と同量とすると、全身ヘパリン化したときとほぼ同様の制御不能出血を惹起することができ、また、凝固能力には大きな影響が出ないことが考えられたのでこの方法を用いて検討することとした。

対照群としては無蘇生群、5%アルブミン生食群、Hb小胞体を5%アルブミン生食に分散し、ヘモグロビン濃度を8.6g/dlとしたHbV群を用いた。

血圧を上昇させるために輸液のスピードを上げると、晶質液による蘇生でも、膠質液による蘇生でも出血量が増加することが明らかにされているため、蘇生時には血圧の上限を45mmHgとして蘇生を継続、組織血流と組織酸素分圧、血中乳酸値を指標として酸素代謝について検討した。

結果としてはHbV群で観察期間の死亡例は無く、他の群では蘇生によっても死亡する例を認めた。出血量の算定でも5%アルブミン群では有意に出血量が多かった。また、組成に必要な輸液量も5%HSA群ではHbV群の3倍強であり、HbV群で出血量が抑制され、また、5%アルブミン生食群では蘇生を続けているにもかかわらず血圧が徐々に低下しており、血圧の制御にHbVが影響を与えている可能性が示唆された。

皮下の酸素分圧の変化に関しては無蘇生群では

著しく低くなった。これは組織の細動脈の収縮による血流定価とFunctional capillary densityが減少したため酸素供給が著しく減少したためと考えられた。これに比し、5%アルブミン生食群とHbV群では組織酸素分圧は低下するものの、一定のレベルで安定し、末梢循環が安定していたためと考えられた。

腹直筋の組織血流をレーザードップラー法で測定したところ、無蘇生群でも一定の血流を保って推移した。5%アルブミン生食群では蘇生開始より徐々に血流が減少し、120分後にはほとんど血流が途絶する状態になった。これは血圧の低下が主な原因と考えられ、制御不能出血の蘇生に膠質液を大量に投与することの危険性を示すものと考えられた。

HbV群では組織血流が保たれ、組織酸素分圧も一定に推移していたので、ショック状態にあるものの、酸素代謝が抑制された状態で安定し、回復可能な状況にあると考えられた。

血中乳酸値は無蘇生群で最も上昇し、HbV群で上昇は認めるものの無処置群に比して上昇が抑制されていた。これは、組織での血流が少ない状況ながら酸素運搬体が機能して組織に酸素供給を行ったため、嫌気代謝が抑制されたと考えてよいものと思われた。

5. 人工酸素運搬体を用いた体外循環における高次脳機能の保護に関する検討

A. 研究目的

心奇形の発生率は1986年の厚生省の全国調査によると1.08%とされている。このうち高度心奇形の症例や新生児期、乳児期に心不全となる症例はこの時期に心奇形に対する手術を行うことが必要となる。新生児期や乳児期に体外循環を用いた手術を行うには体外の回路の初期充填量が循環血液量に比して大量となるので、導入、離脱時の幹事の負担を低減させる努力が必要である。通常成人では体外循環時の初期充填には輸血を用いずとも安定した体外循環を確立することが可能となっている。しかし、新生児、乳児期の体外循環で無輸血で初期充填を行うと、体外循環運転時のヘマトクリットが極端に減少し、術後の高次脳機能に影響を与えるとされており、通常は輸血を用いた初期充填が行われている。

輸血を用いた初期充填は血液を介した感染症の可能性を残すため、可能であればこの方法を避けて、安全な体外循環を確立する方法が必要である。われわれはHb小胞体を初期充填に使用することで、術後の高次脳機能を維持できることを既に報告した。今回、高次脳機能を保護できる要因として、体外循環前後の脳血流および組織酸素分圧の変化についての検討を行うことを目的とした。

B. 方法

我々が確立したラットに対する体外循環モデルを用いた。

尾動脈に送血用の22Gサーフローを留置、右頸静脈より16G脱血カニューレを右心房近傍まで挿入、留置した。体外循環回路はラット用に開発した人工肺を用いPriming Volumeを約35mlの回路を作成し、Heat exchanger (37.5°C)を介在させて脱血路、送血路に接続した。頭部皮膚を切開、剥離して頭蓋を露出、左右に4 mm大の開頭を行い、止血を行っ

た後、硬膜を切開、レーザードップラー血流計を用い右開頭窓の軟膜直下の脳実質にプローブを穿刺、脳実質の血流を測定した。また、左側開頭窓の軟膜下に酸素電極を刺入し、酸素分圧を測定した。

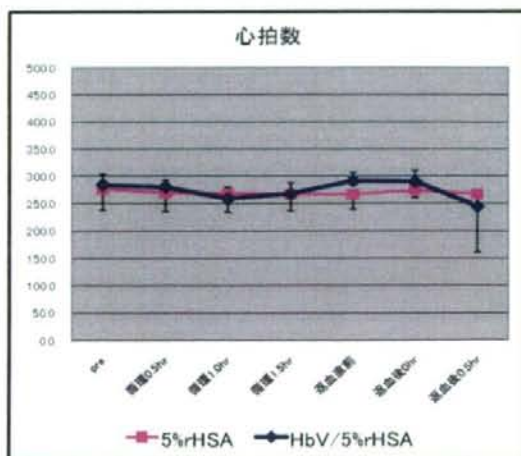
開頭窓の処置が済んだあとに1000 U/kgのヘパリンを静注して全身をヘパリン化した。状態が安定したのを確認した後に体外循環を開始、0.02 L/minから開始して徐々にスピードを上げ、約5分で200 ml/kg/minまで上昇させ、安定化させた。体外循環時間は90分とし、90分後から徐々にポンプ流量を下げ、約5分で停止する。体外循環回路内の血液を回収し、4000 rpm 15分で沈殿した赤血球成分を20分かけて輸注した。測定時点は体外循環開始前、開始後0.5、1.0、1.5、返血開始直前、返血終了直後、返血後30分とした。測定項目は心拍数、脳血流量、脳組織酸素分圧、ヘマトクリットとした。

初期充填液を5% rHSAとした群(5% rHSA群 n=5)と5% rHSAにHb小胞体を分散した溶液とした群(HbV/5% HAS群 n=6)を実施し、比較した。

C. 結果

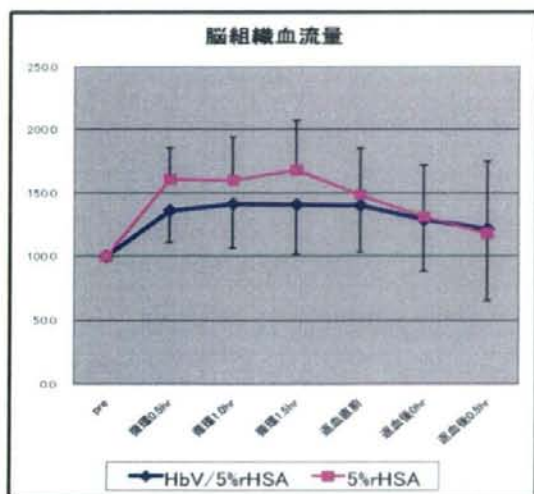
1. 心拍数

心拍数は5% HAS群、HbV/5% HAS群ともに実験終了時まで250~300の間を推移し、明らかな差を認めなかった。



2. 脳組織血流

脳組織血流は体外循環中は5%アルブミン生食群で高値を示し、術前値に比して高値であった。また、HbV群では体外循環中は術前値に比して変化が少なかった。その変化率は5%アルブミン群では体外循環1.5時間後に最高となり、168.0±38.0%であったが、HbV群では体外循環1時間後で141.1±34.5%であり、有意差はないもののアルブミン生食群で高値であった。また、体外循環を終了すると脳血流は5%アルブミン生食群で明らかに減少した。減少率を両群で比較したが、明かな差はなかった。

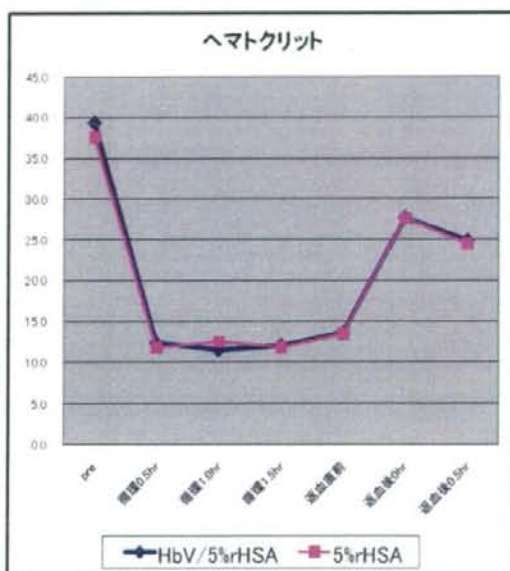
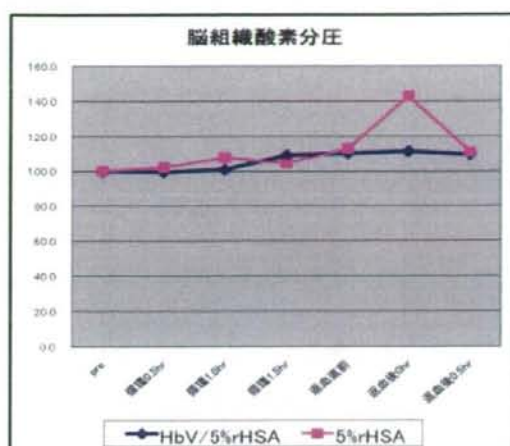


3. 脳組織酸素分圧

脳組織酸素分圧はほとんど変化はなく、両群間に有意差もなかった。

4. ヘマトクリット

ヘマトクリットは体外循環成立とともに著しく低下し、体外循環終了後の回路内の赤血球の返血操作によって上昇が認められた。その変化は両群間でほぼ同様であった。



D. 考察

体外循環が全身の臓器にドラスティックな変化を与えることは周知の事実であり、電解質バランスの管理、尿量の管理、心機能の変化の観察、神経症状や高次脳機能の変化の観察など術後管理には通常の麻酔とは異なる注意が必要である。われわれは学習という高次脳機能の変化についてラットの体外循環モデルを用いて検討してきた。その結果、無輸血にて体外循環を90分行くと、学習機能の低下が遷延することを明らかとした。

無輸血体外循環後の高次脳機能の低下がどのようなプロセスによって引き起こされるかについては体外循環中の脳内での酸素代謝が減少することが原因ではないかと推測されている。

今回われわれはラットを用いた体外循環のモデルを用いて脳内の酸素代謝の変化について検討した。その結果、脳組織の酸素分圧は体外循環の前後を通じてほとんど一定に保たれ、自己制御能力が高いことがうかがわれた。一方、脳組織血流は体外循環開始とともに上昇し、上昇の程度は5%アルブミン生食のほうで大きかった。また、上昇した脳組織血流は体外循環を終了すると減少した。その減少率は5%アルブミン生食群で高く、HbV群では変動が抑制されていた。

脳内の血流は自己調節能に富み、酸素需給によって血流量を自己調節していると考えられており、脳神経より分泌されるnNOSや、アセチルコリン、セロトニン、ドパミンなどの神経伝達物質やカテコラミンが調節にかかわっていると考えられている。

ラットに用いた体外循環の血流量(200ml/kg/min)はヒトに換算すると10L/minとかなりの高流量となっており、ヘマトクリットの低下と凝固能の低下によって各臓器の血流量も上昇していると考えられた。脳血流も上昇を認め、体外循環後には術前値に戻る変化を示し、Autoregulationが機能し、体外循環90分ではこの自己調節能の変調はきたさないことが明らかとなった。特にHb小胞体を用いた初期充填を行った群では脳血流の変動が少なく、脳神経に与える影響が少ないのではないかと推察された。今回の検討では大開頭を行い、頭蓋内圧がほぼ一定の条件下で行った。もし頭蓋が閉鎖状態で検討が行われたと考え、アルブミン生食群では頭蓋内圧が亢進し、脳血流が低下する事態に陥っていたことが予想された。

HbVはヘマトクリットが減少した体外循環状態で酸素供給を行うことにより、脳血流を一定に保ち、頭蓋内圧の急激な変動から脳組織を守ることによって高次脳機能を保持している可能性が示唆された。

6. ヘモグロビン小胞体 (HbV) が免疫系に与える影響

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を通し、HbVの投与により一過性に脾T細胞の増殖が抑制されることを見出した。本研究の目的は、HbVを構成するどの成分がこの現象を引き起こすのか、そして抑制効果発現の機序を解明しHbVの免疫応答変調の詳細を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. Con A刺激およびKeyhole Limpet Hemocyanin (KLH)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。KLH刺激の場合には、以下の如くprimingを行った。50ulの生理食塩水あるいはKLH溶液 (200 μ g KLH in 50 μ L saline) を1mlの50% Incomplete Freund's adjuvantと混和し、その0.5ml (100 μ g KLH)をラットに皮下注し5-7日間をprimingの時期とした。

KLHでprimingしたラットに循環血液量の20% (v/v)に相当するHbV溶液 (あるいはHb分子を内包していない空リポソーム) (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あるいはHb分子を内包しない空のリポソームをラットに輸注後およそ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 \times 10⁵個/200 μ L/ウェル) し、Con A (終濃度0.3, 3 μ g/ml) あるいはKLH(最終濃度3,10, 30 μ g/ml)を加え37 $^{\circ}$ 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 (アマシャム) 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)。また、一部の実験では、HbV投与後にリンパ節を摘出し、脾細胞と同様の処理をしてそのConA刺激に対する反応性を検討した。

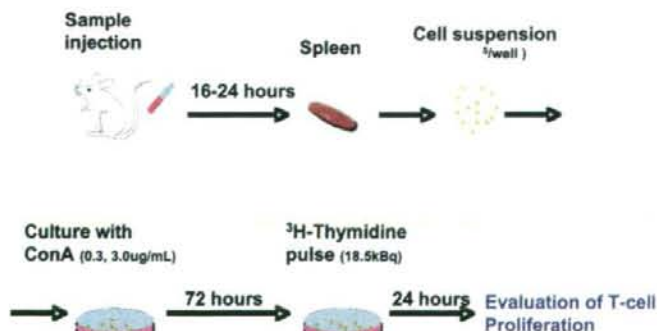


Fig. 1. Experimental protocol for evaluation of the effect of liposome on Con A stimulated T cell proliferation

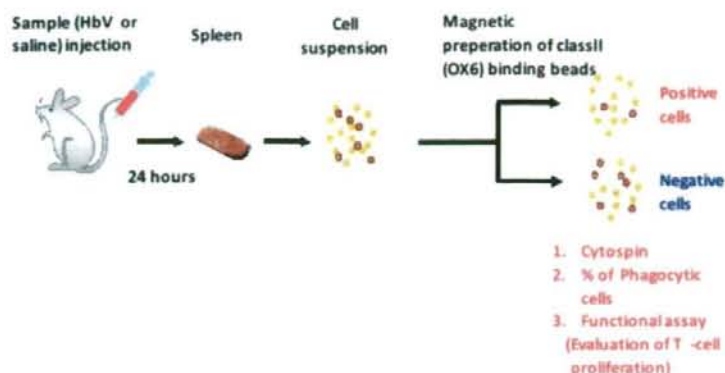


Fig. 2. Experimental protocol for the separation of class II+ and class II- subsets

2. HbVおよびその他のリポソーム

HbVは、ヒトHb分子とこれを内包しているDPPC(1,2- dipalmytol phosphatidylcholin) と cholesterolからなる脂質膜から形成されているが、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 (1,2-O-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate(DHSG)が使われている。故にHbVはHb/PEG-DHSG /Chol/DPPCからなると言える。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/PEG-DHSG修飾のないリポソーム(すなわちChol/DPPCからなる liposome2)、およびHb/DHSG-PEG修飾/cholesterolのないリポソーム(DPPCのみからなる liposome 3)を用いた。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。

HbVとおなじ組成であるがHb分子を内包しない liposome 1 をFITC-lipid(N-(fluorescein-5- thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt)(Molecular Probes, Cat#F-362) で標識した蛍光標識空小胞体 (FITC-vesicles)を調製し、vesicle貪食細胞の同定をするための実験に使用した。

3. 抗体

実験に使用した抗体を以下に示した。

FITC/APC conjugated-anti-CD3(G4.18)、-CD4(OX35)、PE conjugated-anti-CD8a(OX8)、-CD25(OX39)、-CD11a(WT-1)、-CD11b/c(WT-5)、-CD172(OX41)、-PR1(anti-granulocytes)、-CD103(OX62、anti-DCs)、-CD161(NKR-P1A)、-class I(OX18)、-class II(OX6)。これらはすべてBecton Dickensonより購入した。PE conjugated-anti-CD43(W3/13)はSerotecより購入した。

4. Class II 陽性分画と陰性分画のHbV貪食細胞の割合とT細胞増殖反応抑制効果に関する検討
HbVをラットに投与した後、anti-class II(OX6)抗体をコートした磁気beads, anti-MHC classII(OX-6) microbeads, MACS (Meltiny Biotech, Bergishi, Gladbach, Germany)を用いて脾細胞をclass II陽性分画とclass II陰性分画に分け、おのおのをサイトスピンにかけてMay-Grunwald Giemsa染色し、その形態を光学顕微鏡下で観察しHbVを貪食していると思われる細胞の割合を目視にて検討した。同時に、class II陽性分画と陰性分画のT細胞増殖反応抑制効果についても検討した(Fig. 2)。

5. FITCを標識した liposome(FITC-vesicle)を用いた表面マーカーの検討

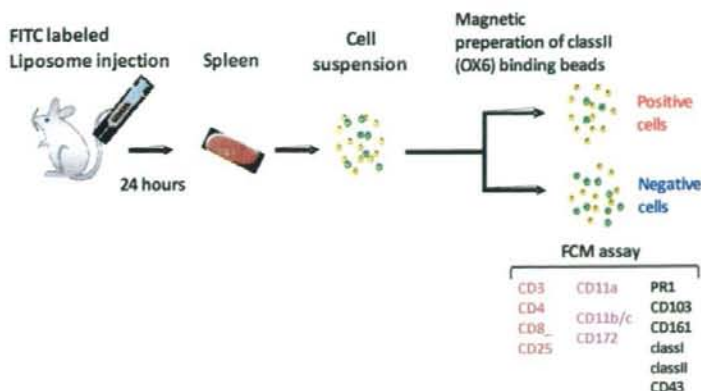


Figure 3. Experimental protocol for cell surface marker analysis of vesicle phagocitosed cells

HbV 小胞体と同じ組成であるが FITC-lipid(N-(fluorescein-5-thiocarbonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt)(Molecular Probes, Cat#F-362) を含有した蛍光標識空小胞体(FITC-vesicles) を調製した。FITC-vesicles を投与後、脾臓を摘出し、細胞浮遊液としたのち、はじめに anti-class II(OX6) をコートした磁気beadsを用いて class II 陽性と class II 陰性の分画に分けた。次にフローサイトメータで、FITC 陽性を示す細胞集団を gate し、その細胞集団の細胞表面マーカーの解析を行った(Fig. 3)。また、一部はサイトスピンをかけたのち、スライドグラスにマウントされた細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

5. Transwell を用いた実験

細胞の CFSE 染色

脾細胞浮遊液($1 \times 10^7/ml$) $1ml$ を $1ml$ のチューブにとり、1%FCS/PBS で 2 回洗浄後 1%FCS/PBS で再浮遊する。続いて CFSE(Invitrogen) を最終濃度 $5 \mu M$ となるように添加し $37^\circ C$ 5min インキュベーションする。その後 1%FCS/PBS で洗浄し次にメディアム (10%FCS/RPMI1640) で洗浄し、同じメディアムに再浮遊した。実験開始前に FCM にて染色されていることを確認した。

Transwell は Flacon 3095 ($0.1 \mu m$)、culture plate は

Falcon plate (Falcon 3504) を用いた。HbV を投与後 16 時間後に取り出したラット脾細胞 4×10^5 個と CSFE で染色したコントロールの脾細胞 (生食投与) 4×10^5 個をそれぞれ上室と下室に入れ Con A $0.3 \mu g/ml$ 存在下で 3 日間培養した。同時に、両者の混合培養も行った。

培養 72 時間後に FCM で細胞の CSFE 蛍光強度の変化を解析した。

C. 実験結果

1. KLH に対する二次免疫応答および Con A 刺激に対する応答の経時的変化

HbV 投与によって、脾細胞のサブセット (CD3, CD8, CD4, HLA class II 陽性細胞) には、調べた限りで顕著な変化を認めなかった (Fig. 4)。

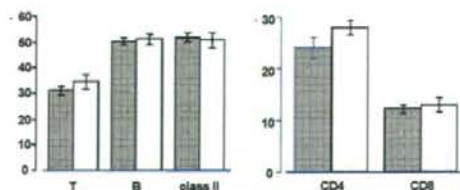


Fig. 4 Cell surface antigen after injection of HbV to rat immunized with KLH. No significant change of subset was observed between splenocytes derived from rat loaded with HbV and saline

■ HbV □ Saline N = 3, Mean ± SEM

Con Aに対する応答性と同様に蛋白抗原であるKLHに対する脾細胞の二次免疫応答の低下は、HbV投与後6時間経過した脾細胞で既に認められるが、投与後7日目には完全に回復していた(Fig. 5)。

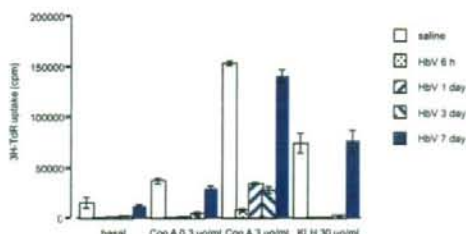


Fig. 5 Kinetics of secondary response against KLH following injection of HbV. Suppression of proliferative response of splenocytes to KLH was observed from 6 hours to 3 days after HbV injection. No suppression was observed 7 days after HbV injection. This was consistent with the results obtained in Con A-stimulated splenocyte proliferation.

2. 空リポソーム投与のラット脾細胞の増殖反応への影響

空リポソームもHbVと同様にラット脾細胞のConA刺激による増殖反応を抑制することが明らかとなった。その抑制効果は低濃度のCon Aでより顕著であった(Fig. 6)。

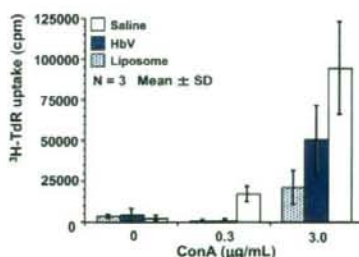


Fig. 6 Effect of empty liposome on the proliferation of Con A-stimulated rat splenocytes. Like HbV, the injection of empty liposome also made splenocytes unresponsive to Con A.

3. HbV投与のラットリンパ節由来細胞の増殖反応への影響

HbV投与後にリンパ節を摘出し、リンパ節細胞のCon A刺激に対する増殖反応を検討した。低濃度

ConA刺激では増殖が抑制される傾向が認められるものの統計学的な有意差はなかった。高濃度Con A刺激でも有意差はあるものの抑制効果は高々50%程度であった(Fig. 7)。

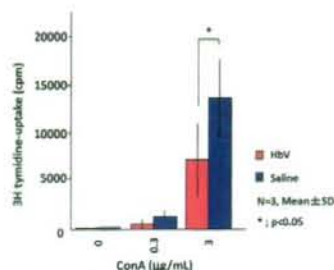


Fig. 7 The effect of HbV on the proliferation of lymphnode cells. Lymphnode cells were taken after injection of HbV and stimulated with Con A. The immune response tended to be suppressed but it was not statistically significant even at low dose of Con A.

4. HbVあるいは空リポソーム投与ラットの脾細胞のsaline投与ラット脾細胞増殖反応への抑制効果について

HbVあるいは空リポソーム投与脾細胞を混和した場合には、saline投与ラットの脾細胞の増殖反応は、低濃度(0.3 µg/ml)のConA刺激においては、コントロール(salineを投与されたラット脾細胞のみ)と比較して明らかに抑制されていた。従って、HbVあるいは空リポソーム投与ラットの脾細胞にはCon Aにより刺激されたリンパ球の増幅を抑制する活性が存在していると言える(Fig. 8)。

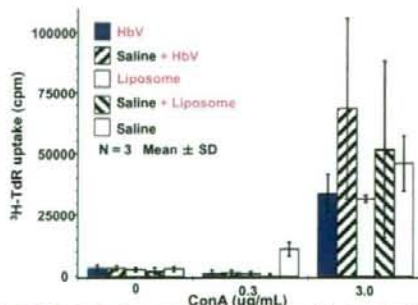


Fig. 8 Effect of splenocytes derived from rat injected with HbV or empty liposome on the proliferation of splenocytes derived from control rat. Both HbV or empty liposome loaded splenocytes exerted suppressive effect on the Con A-stimulated proliferation of saline loaded splenocytes at low concentration of Con A(0.3µg/ml).

5. 種々のリポソーム投与後の脾T細胞の増殖反応の検討

組成を単純化した各種リポソームをラットに投与し、翌日に脾臓を摘出し、その重量と組織学的検討を行った。脾臓重量は、salineを投与したラットの脾臓と比較すると、すべてのリポソーム投与後に増加していた。また組織学的にも、豊富な細胞質をもつ細胞が赤脾髄に少なからず出現し、それらがリポソームを貪食した細胞であると推定された。一方、Intralipidを投与したラット脾臓にはsaline投与ラットの脾臓との差異は認められなかった(Fig 9, 10)。

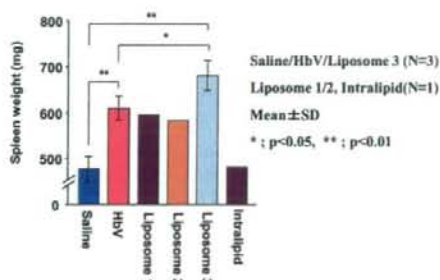


Fig. 9 Weight of spleen
The spleen increased in weight after injection of liposomes compared to saline, but Intralipid.

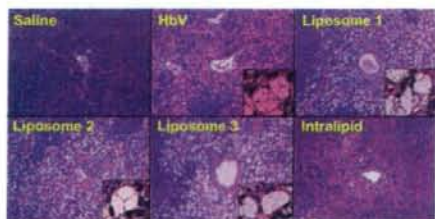


Fig. 10 Microscopic examination of spleen taken after the injection of liposome.
In the case of spleen loaded by HbV and liposomes, cells with the enlargement of cytoplasm was clearly observed in red pulp

また、空リポソーム(liposome 1)はHbVと同様に脾T細胞の増殖反応を抑制したがliposome 2, liposome 3も同様の効果のあることが明らかとなった(Fig.11, 12)。以上の結果をTable Iにまとめた。

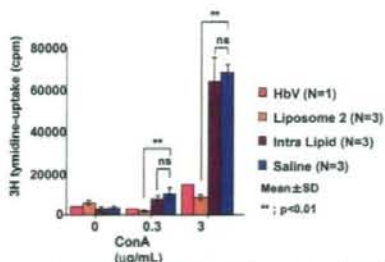


Fig. 11 The effect of HbV and liposome 2 on the proliferation of Con A-stimulated splenic T cells. The injection of both HbV and liposome 2 affect the proliferation of splenic T cells, but not the injection of Intralipid.

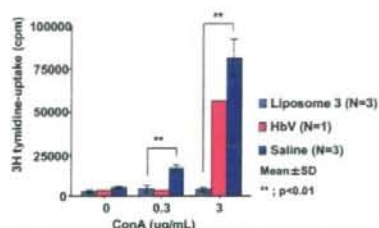


Fig. 12 The effect of HbV and liposome 3 on the proliferation of Con A-stimulated splenic T cells.
The injection of both HbV and liposome 3 affect the proliferation of splenic T cells.

Table 1. The effect of each liposomes on Con A stimulated T cell proliferation

	Hb	PEG	CHO	DPPC	DHSG	Accumulation	Inhibition
HbV	+	+	+	+	+	+	+
Liposome 1	-	+	+	+	+	+	+
Liposome 2	-	-	+	+	-	+	+
Liposome 3	-	-	-	+	-	+	+
Intralipid	-	-	-	-	-	-	-

Except for Intralipid, HbV, liposome 1, 2 and 3 showed inhibitory effect

6. Class II陽性分画と陰性分画中のHbV貪食細胞の割合と機能および形態

HbV投与後、脾細胞をClassII陽性と陰性分画に分けMay-Grunwald-Giemsa染色後の顕微鏡下で観察した結果、前者は大型のマクロファージ/モノサイト様の細胞であり後者は楕円形の偏在する核と豊富な細胞質を持った未熟な骨髄球様の細胞であった

(Fig. 13)。HbVを貪食していると考えられる細胞の割合を算出すると、Class II陽性分画と陰性分画中の貪食細胞の割合は後者は約15%で前者の3倍強であった(Fig 14)。

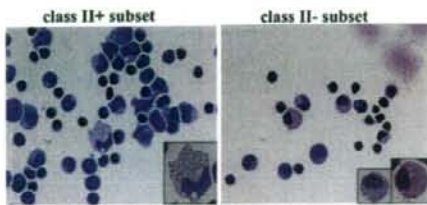


Fig. 13 Morphologic feature of class II+ or class II- fraction
HbV loaded rat spleen cells were divided into 2 subset by magnetic beads and each subset was stained with May-Grunwald-Giemsa. Both macrophage like cell and lymphocyte like cell are present in class II+ subset, in contrast myelocytelike cells with abundant cytoplasm and small lymphocyte cells are present in class II- cells.

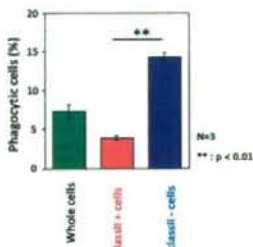


Fig. 14 Percentage of HbV phagocytised cells.

The percentage of HbV phagocytised cells was 3-4 times higher in class II negative subset than in class II positive subset.

コントロール脾細胞のCon A刺激を各々の分画の存在下で行うと、どちらの分画でも増殖抑制効果が認められた。Class II陰性分画では、class II陽性分画の1/5の細胞数でも抑制が認められた(Fig 15)。

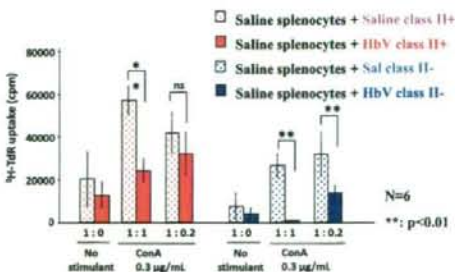


Fig. 15 The effect of class II positive and class II negative subset on splenocytes proliferation.

Both subsets were shown to have suppressive effect on the proliferation of saline loaded-splenocytes. The effect of class II negative subset was stronger than that of class II positive subset.

7. FITC-vesicle陽性細胞の形態とその表面マーカーの検討結果

FITC-vesicle投与後に摘出した脾細胞中には、フローサイトで、FITC 陽性を示めず細胞群が認められ、それらの細胞がvesicleを貪食しているものと考えられた。光学顕微鏡にて脾細胞を観察した結果細胞質内に多数の顆粒を内包した細胞が観察された。蛍光による観察に切り替えると、同一の細胞の細胞質が顆粒の蓄積している部分に一致して蛍光を発していることが確認された(Fig. 16)。

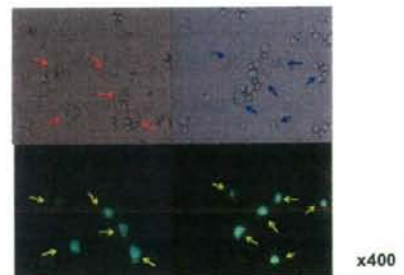


Fig. 16 Recognition of cells that phagocytised FITC-labelled vesicle by fluorescence microscopy. Light microscopy revealed the presence of cell with foamy or granulated cytoplasm. The same cell were shown to be positive for fluorescence intensity. Left: class II positive subset, right: class II negative subset

前述のごとく、class II陽性細胞分離用の磁気ビーズを用い、脾細胞をあらかじめ、class II陽性分画と陰性分画に分け、その後、フローサイトメーターにてFITC陽性細胞のみをゲートし、その細胞集団の表面マーカーの解析を行った(Fig. 17)。これらの結果を表にまとめた。すなわち、class II陰性あるいは陽性にかかわらず、どちらの分画の細胞もCD3-、CD8 +/-、CD4 low、CD11a+、CD11b/c+、CD172+、PR1-、CD103-のフェノタイプを持っていた。

8. T細胞の増殖抑制における細胞接触の必要性

リボソーム投与後に脾臓に出現する抑制性細胞の作用に細胞間のcell-to-cell contactが必要であるか否かを検討した。コントロールの脾細胞はCon A刺激により細胞分裂をするが、それらがHbV投与後に採取された脾細胞と混合されると細胞分裂が起きない事がわかる(Fig. 18)。すなわち、増殖が抑制さ

れている。しかしながら、Transwellを用いて、両者の接触を阻害すると、細胞分裂が認められた。従ってHbV投与後の脾細胞中に存在していると考えられる抑制性細胞が作用するためには、抑制性細胞とT細胞との直接的な接触が不可欠であることが示された。

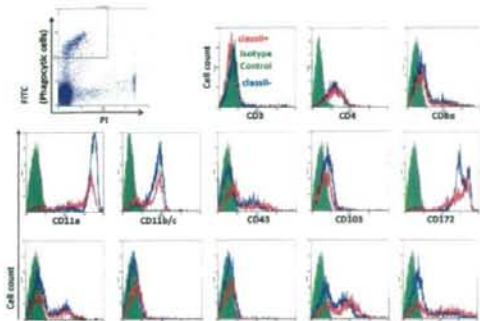


Fig. 17 Flow cytometric analysis of cell surface markers of cells positive for FITC intensity. FITC positive cells expressed both CD11b/c and CD172.

Table II Summary of cell surface marker analyses

	classII+	classII-	Rat MDSCs (non-T)
CD3	-	-	-
CD4	+	+	+
CD8α	+/-	+/-	+
CD11a	+	+	+
CD11b/c	+	+	+
CD43	+/-	+/-	N.D
CD103 (anti-DCs)	-	+	+
CD172	-	+	+
CD161	+/-	+/-	N.D
PR1 (anti-granulocyte)	-	+	N.D
CD25	-	+	+
MHC class II	-	+	+
MHC class I	+	-	-

Class II positive subset and negative subset were identical in terms of cell surface antigen. In addition, their phenotype were shown to be similar to those of rat MDSC

C. 考察

ラットにHbVを投与すると1)脾細胞中のT細胞の増殖反応が抑制されること、2)その抑制は非特異的刺戟(Con A)および蛋白抗原であるKLHに対する二次免疫応答においても認められること、3) 抑制効果は投与後1週間で完全に回復することを確認できた(Fig 5,6)。また、この抑制効果は脾臓特異的ではなく、リンパ節においても認められたが、抑制の程度は脾細胞と比較するとより軽度である可能性が示唆された(Fig. 7)。HbVにより一過性に引き起

こされるこの免疫応答の抑制(あるいは変調)はHbV投与後1週間で完全に回復すること、リンパ節での免疫応答の抑制が脾臓のそれと比較して軽度であることは、ヒトへの影響を考える上で重要である。すなわち、ヒトへ投与した場合にも免疫学的変調は認められる可能性があるものの、短期間に回復すると期待できる。

HbV(あるいは空リポソーム)投与ラットの脾細胞とsaline投与ラットの脾細胞との混合実験の結果から、リポソームを投与すると脾臓内にT細胞の増殖を抑制する活性が誘導されることを示唆する結果を得た(Fig. 8)。

この結果に基づきHbVによる免疫抑制効果がその構成成分のどれにより誘導されるかを詳細に検討した結果、実験に使用した4種類のリポソームはすべて投与後に脾臓に集積しかつ脾臓に抑制性細胞活性を誘導することがわかった。特にその基本構成要素であるDPPCのみからなるリポソーム投与でも同様の現象が認められたことは、現在の脂質組成で構成しているHbVを使用する限り、この現象の発生を回避することは困難であることを意味する。むしろ、脾臓に集積するような性質もつリポソーム製剤の多くで同様のことが観察される可能性が高いと思われる(Fig. 9-12, Table I)。

そこで我々は、HbVあるいは多くのリポソームが持つであろう免疫抑制作用の機序を解明しておく必要があると考えさらなる検討を進めた。

はじめは、class II抗原の発現の有無により脾細胞を分類した。その結果、classII陽性分画および陰性分画にそれぞれに認められる貪食細胞はMay-Grunwald-Giemsa染色では、あきらかに形態学的には異なっていた。すなわち、前者は大型のマクロファージ/モノサイト様の細胞であり後者は楕円形の偏在する核と豊富な細胞質を持った未熟な骨髄球様の細胞であった(Fig. 13)。貪食細胞の割合は後者に多かった(Fig. 14)。抑制活性はどちらの分画にも検出されたが後者の活性がより高かった(Fig. 15)。従って、リポソームを貪食する細胞には、

class II陽性でマクロファージ/モノサイト様の形態を持つ細胞と、class II陰性で未熟な骨髄球様の細胞の2種類が存在する可能性がある。ただし、細胞あたりの抑制活性に差があるか否かは判別できなかった。

以上の解析で、リボソーム貪食細胞とみなした細胞は、あくまで形態学的な観察に基づいているので、それがリボソームを貪食した細胞であるとの確証は得られていない。そこで、リボソームをFITCで標識したFITC-vesicleを用いて貪食した細胞をフローサイトメーターで特定することを考えた。まず、光学顕微鏡でリボソームを貪食した細胞に一致して蛍光が陽性であることが確認できた(Fig 16)。これらの細胞はフローサイトメーターでも容易にFITC 陽性の細胞として検出できることが判明したのでリボソーム貪食細胞に焦点をあてた詳細な細胞表面マーカー解析を行う事ができた。その結果、FITC-vesicle貪食細胞はclass IIの発現の有無に関わらず、モノサイト系のマーカーであるCD11b/cおよび骨髄球系のマーカーであるCD172が陽性であった。しかし末梢血顆粒球のマーカーであるPR1は陰性であった。またT細胞マーカーであるCD3、CD25は陰性であったがCD4に関しては、intensityは低いながらも陽性であった。さらに樹状細胞のマーカーであるCD103はわずかに発現しているのみであった(Fig 17, Table II)。このフェノタイプはclass II陽性細胞群を除くとラットにおけるMDSCのマーカーを詳細に検討した既報の文献のそれと一致した。従って、少なくともclass II陰性分画中に存在するリボソーム貪食細胞はMDSC類似の細胞群である可能性が高い。また、マウスの系ではMDSCには形態学的に2種類あることも示されていることからclass II陽性を示すリボソーム貪食細胞も少なくとも機能的にはMDSCに属すると考えてよいのかも知れない。

Transwellを使った実験(Fig.18)が示すように、抑

制性細胞の作用が発揮される為にはおそらくT細胞との直接的な接触が不可欠であり、この結果は、一酸化窒素が抑制作用の発現に関与しているという過去の結果とともにMDSCの機能発現の機序に矛盾しない。

以上のことから以下の機序が考えられる。HbVを含めたリボソームが輸注され、それらが血流に乗って脾臓を通過する際に、脾臓内の貪食細胞に取り込まれる。リボソームを貪食する細胞の大部分はMDSC類似の細胞である。これらの細胞は通常は免疫応答に対する強い抑制活性を有しないが、リボソームを貪食することによりその活性が増強されると考えられる。これらの細胞はcell-to-cell contactを介して、直接あるいはNOの産生などを介してT細胞の増殖を抑制する。

しかしながら、最終的にはリボソームを貪食した細胞を除去することにより、抑制活性が低下することを確かめなければならない。また、NO以外の何らかの液性因子(例えばTGF- β のような抑制性サイトカイン)の関与があるか否かなど今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

ラットにHbVを大量に投与すると一過性の免疫抑制状態が誘導されるが、投与後1週間で完全に回復した。この現象はHbVの基本組成であるDPPCのみからなるリボソームでも観察された。また、その機序としては、投与されたHbVを貪食したMDSC類似の細胞が一過性に免疫抑制作用を発現することが考えられる。従って、この現象はHbV投与後の生理的反応とも言える。ヒトにHbVを投与した場合にも同様の反応が誘導される可能性を考慮する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

7. Hb小胞体の体内動態特性に関する検討

A. 研究目的

臨床試験に新規薬物が進むためには、前臨床試験での製剤化・薬物動態・薬理・安全性試験など数多くの試験をクリアする必要がある。これまでにヘモグロビン小胞体(HbV)の血液生化学的パラメータの測定、血行動態、免疫系への影響等に関する検討が行われ、製剤化・薬理試験及び安全性に関する基礎知見が得られているが、HbVの体内動態についての検討は殆ど行われていない。HbVは赤血球代替物として用いられるため大量投与が予想される。HbV構成成分であるヘモグロビン(Hb)やコレステロールは生体内に大量に存在すると腎障害や心血管疾患のリスクファクターとなりうる。また、人工酸素運搬体の一種であるパーフルオロカーボンはその代謝性の悪さ(生体内での長時間蓄積)により、臨床試験からドロップアウトしたことは、よく知られている(1)。そのため、HbV構成成分の分布・代謝・排泄性を把握することが必要である。

加えて、HbVのようなリポソーム製剤は健常時に比べ、病態時及び頻回投与時において体内動態が変動することが報告されている(2, 3)。HbVを現行の輸血で用いられる濃厚赤血球と同様のシステムで臨床使用された場合、出血性ショック時に用いられること、また、頻回投与されることは十分に考えられる。病態時及び頻回投与時にHbVの体内動態が変動するとHbVの薬理作用の変動や副作用の原因になりうる。そのため、病態時及び頻回投与時におけるHbVの体内動態を知ることはHbVを有効かつ安全に用いるための投与設計を行う際に必要不可欠な基礎情報である。

そこで本研究では、HbVの内部のHbを¹²⁵I標識した¹²⁵I-HbVならびに脂質膜を構成するコレステロールを³H標識した³H-HbVを用いて、健常マウス・ラットにおけるHbV構成成分の体内動態の詳細の評価、さらにはHbVの出血性ショックモデルラット

における体内動態特性を評価した。また、HbV頻回投与時の体内動態について健常マウスを用いて検討を行った。さらに、得られた結果からアニマルスケールアップを試み、ヒトにおけるHbVの半減期の予測を行った。

References

- (1) Nose Y *Artif Organs* 28 (2004) 807-812.
- (2) T.J. Walsh, V. Yeldandi, M. McEvoy, C. Gonzalez, S. Chanock, A. Freifeld, N.I. Seibel, P.O. Whitcomb, P. Jarosinski, G. Boswell, I. Bekersky, A. Alak, D. Buell, J. Barret, W. Wilson, *Antimicrob Agents Chemother* 42 (1998) 2391-2398.
- (3) T. Ishida, M. Harada, X.Y. Wang, M. Ichihara, K. Irimura, H. Kiwada, *J Control Release* 105 (2005) 305-317.

B. 研究方法

1. 動物

ddY系雄性マウス(6週齢、28~30g)は日本SLCより購入し、SD系雄性ラット(6週齢、180-220g)は九動より購入した。1週間の予備飼育後、7週齢で実験に使用した。また、甲状腺へのヨウ素の蓄積を防ぐために、体内動態実験開始1週間前より5mM NaI溶液を自由飲水させることでヨードブロックを行い、実験に用いた。

2. 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。

3. ¹²⁵I-HbV 投与液の調製

HbV の ¹²⁵I ラベル化は IODO-GEN Iodination Reagent(Pierce)を用いて行った。動物実験における投与液は標識体を非標識体で希釈して調製した。なお、遺伝子組み換え型ヒト血清アルブミン(rHSA, 5g/dL)を添加することで浸透圧の調節を行った。

4. ^3H -HbV投与液の調製

^3H ラベル化はHbVとCholesterol,[1,2- ^3H (N)]を混合し標識した(37°C, 12時間)。標識後、0.45nmの滅菌済フィルター (Dismic-25cs, Advantec) で処理後、投与液とした。なお、遺伝子組み換え型ヒト血清アルブミン(rHSA, 5g/dL)を添加することで浸透圧の調節を行った。

5. 健常マウス・ラットへの ^{125}I -及び ^3H -HbVの投与

雄性マウス(エーテル麻酔下)及びラット(ペントバルビタール麻酔下)に、 ^{125}I -HbV を 10×10^5 cpm/匹の用量でマウスは尾静脈より、ラットへは左大腿静脈より投与した(1400 mg/kg)。

^3H -HbV の場合、 3×10^5 dpm/匹の用量で尾静脈内投与した(1400 mg/kg)。

6. 出血性ショックモデルラットの作製及び心循環動態パラメータの測定

SD ラットに非絶食、ペントバルビタール麻酔下で、左大腿動脈に挿入したポリエチレンチューブ(PE-50)より規定時間に規定量の脱血を行い、全血液量の40%の血液を脱血し、最終脱血終了10分経過後を出血性ショックモデルラット作製終了とし、HbV 投与液を投与した。またその際、平均動脈圧、収縮期・拡張期血圧、脈拍数は右大腿動脈に挿入した PE-50 を観血式血圧計に接続しモニタリングを行った。

出血性ショック誘起時には平均動脈圧、心拍出量、平均心拍数は、脱血開始直後に 79.9 ± 4.3 mmHg から 30.1 ± 1.8 mmHg、 26.4 ± 3.2 mmHg から 15.3 ± 3.1 mmHg、 369 ± 44 beats/min から 290 ± 43 beats/min までそれぞれ低下した。また、蘇生まで平均動脈圧は 40mmHg 以下に保たれていた。加えて、脱血後、pH の 7.55 ± 0.06 から 7.51 ± 0.05 へ低下し、乳酸値の 21.4 ± 4.0 mg/dL から 62.8 ± 17.5 mg/dL へ上昇した。さらには皮膚の蒼白・呼吸数の上昇も同時に確認された。

4. 血清パラメータの測定

出血性ショックモデルラットを作製した際、0分及び蘇生直前に脱血した血液(約 2mL)をそれぞれ baseline、脱血直後のサンプルとし、直ちに pH メーター(HORIBA)で pH の測定を行った。その後、HbV(1400mg/kg)及び生理食塩水(22.4mL/kg)を投与した。投与後7日目に下大静脈から約 3mL 採血した。血清パラメータの測定は株式会社 SRL に委託し、乳酸値、アルブミン、リン脂質、総コレステロール、遊離型コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、AST、ALT、 γ -GTP、HDL-コレステロール、鉄、リパーゼ、アミラーゼの測定を行った。

7. 出血性ショックラットへの ^{125}I -HbVの投与

SD ラットに非絶食、ペントバルビタール麻酔下、PE-50 を右大腿静脈に挿入後、 ^{125}I -HbV を右大腿静脈より投与した(1400 mg/kg)。

8. 頻回投与実験での投与方法及び投与量

ddY 雄性マウスに非絶食、エーテル麻酔下において、非標識 HbV を 0.1 及び 1400 mg/kg で尾静脈より投与し、投与 7 日後に ^{125}I -HbV を約 10×10^5 cpm/匹の用量 (0.1 及び 1400 mg/kg)で投与した。

9. ^{125}I -HbVの採血、放射活性の測定・分析

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ーカウンター(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ー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。

10. ^3H -HbVの採血、放射活性の測定・分析

投与後、経時的に開腹し、下大静脈から採血を行い、得られた血漿を 19000rpm 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 (10,000NMWL, Millipore) を用いて ^3H -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)。摘出した臓器は重量を秤量し、その一部を可溶化後、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、MULTI により半減期及び各臓器クリアランスを算出した。

11. 抗 HbV IgG 及び IgM の検出

ddY 雄性マウスに非絶食、エーテル麻酔下において、非標識 HbV を 0.1 及び 1400 mg/kg で尾静脈より投与し、投与後 3、7、10 日後にヘパリン処理したシリンジで下腹静脈から 1mL 採血後、3000rpm で遠心分離を行い、血漿を得た。残存 HbV を除去するために超遠心処理 (50000 g, 30 min) を行い、上清を血漿サンプルとした。

96well プレートに空小胞体、DPPC, cholesterol, DPEA 及び DSPE-PEG を固定化し、アルブミン溶液で blocking 後、希釈した血漿サンプルを添加し、37°C, 1 時間インキュベートした。wash 後、Horseradish peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse IgG または peroxidase-labeled affinity purified antibody to mouse IgM (μ) を添加し 37°C, 1 時間インキュベートした。*o*-phenylene diamine で発光後、490nm の吸光度で評価した。

12. 解析

速度論解析は解析ソフトMULTIにより2-コンパートメントモデルをして解析した。取り込みクリアランスはintegration plot解析により算出した。ヒトへの外挿はアロメトリック式を用い、ヒトにおける分布容積・クリアランスを予測した後に、消失速度定数(ke)を算出し、以下の式より半減期を予測した。

$$t_{1/2} = 0.693/ke$$

また、有意差検定は解析ソフトANOVAを用い、 $p < 0.05$ を有意な差とした。

C. 結果および考察

1. HbV構成成分の体内動態

(1) 血漿中濃度推移と各パラメータ変化

^{125}I -HbVならびに ^3H -HbVを用い、HbVの血漿中濃度推移について健常マウス・ラットにおいて検討した。Fig. 1にはddYマウスに ^{125}I -HbVあるいは ^3H -HbVを投与後の血漿中濃度推移を、Table 1にはddYマウス及びSDラットの血漿中濃度推移より得られた体内動態パラメータを示す。その結果、 ^{125}I -HbVと ^3H -HbVの血漿中濃度推移曲線及び体内動態パラメータはよく一致しており、静脈内投与後の代謝臓器までの移行はintactな状態であることが確認された。

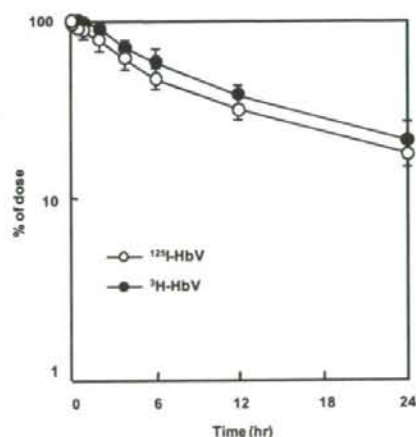


Fig. 1. Relative plasma concentration of ^{125}I -HbV and ^3H -HbV after i.v. administration to mice. Each point represents the mean \pm SD (n = 3-6).

Table 1 Pharmacokinetic parameters of HbV after administration of ^{125}I - and ^3H -HbV to mice and rats.

	mice		rats	
	^{125}I -HbV	^3H -HbV	^{125}I -HbV	^3H -HbV
$T_{1/2p}$ (hr)	18.8 \pm 1.3	19.9 \pm 0.9	30.6 \pm 4.0	30.9 \pm 4.7
AUC (hr*% of dose/mL)	829 \pm 28	899 \pm 44	210 \pm 23	247 \pm 22
CL (mL/hr)	0.12 \pm 0.04	0.11 \pm 0.03	0.46 \pm 0.04	0.41 \pm 0.02
V_d (mL)	1.75 \pm 0.6	1.71 \pm 0.1	10.9 \pm 0.2	10.2 \pm 2.0

The values are mean \pm S.D. (n=3-6).

(2) 肝臓及び脾臓における分布推移

次にHbVをラットに静脈内投与8時間後における各臓器への放射活性の分布を検討したところ、マウス・ラットにおいて、 ^{125}I -HbV、 ^3H -HbV両標識体とも、主に肝臓、脾臓へ分布していた。また、マウス初代肝実質・内皮細胞及びマクロファージ系細胞RAW cellを用いた評価系により、その取り込みはRAW cell特異的であったことから、HbVの代謝臓器として、主に肝臓・脾臓が担っている可能性が示唆された。また、肝臓、脾臓における、 ^{125}I -HbV及び ^3H -HbVの分布推移について検討したところ、 ^{125}I -HbVは取り込みを受けた後、速やかに各臓器から消失するのに対して、 ^3H -HbVは取り込みを受けた後、臓器に一時的な蓄積性を示すことが確認された。しかしながら、 ^{125}I -HbVは投与後5日以内に、 ^3H -HbVは投与後14日以内に臓器から消失した。また、肝臓・脾臓における ^{125}I -HbV及び ^3H -HbVの初期取り込みクリアランスがほぼ一致したことから、HbVはintactな状態で各臓器へ取り込まれることが確認された。

(3) 糞中及び尿中排泄推移

^{125}I -HbV及び ^3H -HbVの排泄について検討した結果、 ^{125}I 標識体は主に尿中へと排泄され、 ^3H 標識体は主に糞中に排泄された。

(4) ヒトへの外挿

これまでに、Souらは $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAOを内封したHbVを用い、ラット・ウサギに投与した検討結果から、HbVの健常人での半減期は約66時間と見積もっている。そこで、これらの文献値に今回の結果を加味してヒトでの体内動態の予測、いわゆるアニマルスケールアップを試みた。一般的にアニマルスケールアップを行う際、アロメトリック式より算出される。そこで、今回得られた結果とSouらの報告から、アロメトリック式により、ヒトにおける半減期の予測を行った。その結果、ヒトにおけるHbVの半減期は、約96時間程度と予測され、

この結果とSouらの報告を加味し、HbVの半減期は3-4日程度であると考えられる。

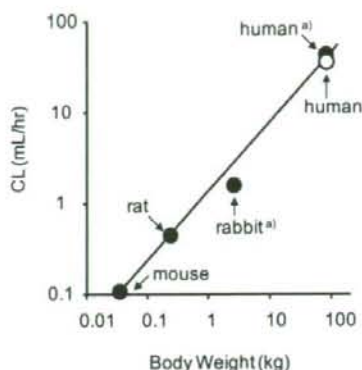


Fig.2 Allometric relationships between body weight and clearance (CL). The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method ($r^2=0.984$). The extrapolated human values based on a body weight of 70 kg (open circle) are also shown. ^a Data from Reference Sou *et al* (JPET, 2004)

(5) 小括

HbV構成成分の体内動態を明らかにするために、HbV内部のHbを ^{125}I 標識した ^{125}I -HbVならびに脂質膜を構成するコレステロールを ^3H 標識した ^3H -HbVを用いて、マウス及びラットにおける体内動態について検討した結果、HbV構成成分の各速度論パラメータが明らかとなった。また、HbVは血中でintactな状態で循環後、主に肝臓・脾臓で代謝を受け、分解後のHbVの ^{125}I 標識体は主に尿中から ^3H 標識体は主に糞中から14日間以内に生体内から排泄されることが明らかとなった(Fig.2)。さらに、これらの傾向はマウス・ラットの2種類の動物間で変化はなかった。これらの結果より、HbVが生体内で安定であり、かつ十分な代謝性を持ち、生体内蓄積がないことが確認された。加えて、アロメトリック式を用い、アニマルスケールアップを行い、ヒトでのHbVの半減期を予測したところ、約96時間程度と予測され、この結果とSouらの報告を加味すると、HbVの半減期は3-4日程度であり、自己血回復までの十分な血中滞留性を保持することが示唆された。

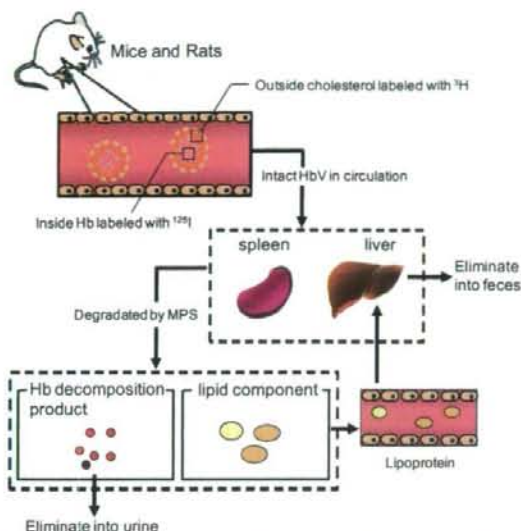


Fig.3 Representation of a sequence of HbV disposition, metabolism and excretion from pharmacokinetic examinations using ^{125}I -HbV and ^3H -HbV.

2. 出血性ショック時でのHbVの体内動態

(1) 血清パラメータ

出血性ショック時に HbV(1400mgHb/kg)を投与することにより、血清パラメータにどのような影響を及ぼすか、生理食塩水(22.4mL/kg)投与群と比較した。その結果、脱血後に腎機能マーカーであるクレアチニン値の有意な上昇が確認されたが、もう 1 つの腎機能マーカーである尿素窒素(BUN)及びその他のパラメータに有意な差は確認されなかった。投与後 7 日目においては、両投与群とも AST 値のみ脱血前(74.0±9.3 IU/L)に比べ、有意な上昇が確認された(HbV 投与群; 119.3±28.8 IU/L、生理食塩水投与群; 101.8±11.4 IU/L)。脱血後に上昇したクレアチニン値は投与 7 日後には脱血前までの値に回復していた。また、HbV 投与群と生理食塩水投与群を比較したところ、いずれのパラメータ間にも有意な違いは認められなかった。加えて、そのほかのパラメータ(アルブミン、リン脂質、総コレステロール、遊離型コレステロール、尿素窒素、ALT、 γ -GTP、HDL-コレステロール、鉄、リパーゼ、アミラーゼ)に変化は確認されなかった。

(2) 血漿中濃度推移

出血性ショックモデルラットに ^{125}I -HbV を 1400 mgHb/kg で投与後の血漿中濃度の変化を検討した。Fig. 2 には投与後 72 時間までの血漿中濃度推移の結果を健常ラットの血漿中濃度推移とともに示す。図から明らかなように、健常時に比べ出血性ショック時において投与初期から急激な血漿中濃度の低下が確認された。

また、血漿中濃度曲線より得られた各速度論パラメータは、健常群と比較すると出血性ショック群では分布相半減期 ($t_{1/2\alpha}$) が約 1/10 倍に、消失相半減期 ($t_{1/2\beta}$) が約 2/3 倍に減少し、それに伴って、血中濃度曲線化面積の低下 (126.5 h*% of dose/mL)、クリアランスの増加 (0.8 mL/hr) 及び消失速度定数の増加 ($1.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) が確認された。また、末梢コンパートメントの分布容積を示す V_2 の値は出血性ショック群で約 2 倍に増加した。さらに興味深いことに、中枢と末梢のコンパートメント間の移行性を示す k_{12}/k_{21} の値は健常群では 1 以下であるのに対して、出血性ショック時では 1 より大きくなっていった。これら V_2 や k_{12}/k_{21} 値の増大より、出血性ショック時には組織への移行性が亢進していることが強く示唆された。

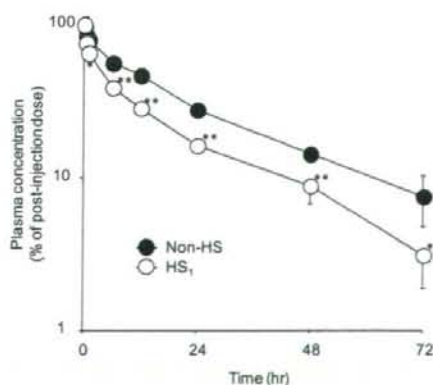


Fig.4 Relative plasma concentration of ^{125}I -HbV after administration of 1400mg Hb/kg via injection of non-HS or HS₁. Each point represents the mean \pm SD (n=5). * <0.05 or ** <0.01 vs. non-HS rats.

(3) 臓器分布

次にHbVの各臓器への経時的な分布推移について検討した。その結果、HbVは出血性ショック群の方が投与初期から臓器に高い割合で分布していることが判明した。

(4) 排泄経路

健常群及び出血性ショック群におけるHbVの糞中及び尿中排泄量を検討した結果、投与3日後までに健常群及び出血性ショック群でそれぞれ投与量の約65%及び約60%が尿中に排泄され、糞中への排泄は両投与群ともほとんど確認されなかった(Fig.5)。また、いずれの測定時間においても両群間で有意な違いが認められなかったことから、出血性ショック時においても、HbVの排泄経路や排泄量に大きな差異が生じず、体内残存量は等しいことが明らかとなった。

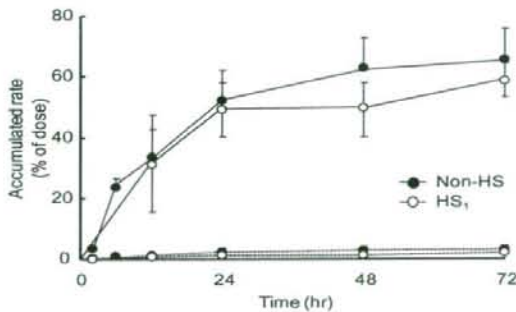


Fig. 5 Time-dependence of urinary and fecal radioactivity after administration of ^{125}I -HbV to non-HS or HS₁. The solid line represents urinary excretion, and the dotted-line represents fecal excretion. Each point represents the mean \pm SD (n=3).

(5) 小括

HbVの臨床適応である出血性ショック時における体内動態を40%出血性ショックモデルラットを用い、体内動態特性を評価し、HbVでは初めて出血性ショック時における体内動態を明らかにすることに成功した。その結果、出血性ショック時でのHbVの半減期は健常時に比べ低下するものの、臓器移行性の増加や排泄量に変化しないことから、出血性ショック時と健常時での体内残存量は等しく、

出血性ショック時でのHbVの半減期の低下は臓器移行性の増大による見かけの血漿中濃度の低下であることが示唆された。

3. 頻回投与時のHbVの体内動態

(1) 血漿中濃度推移

近年、リボソーム製剤を、ある一定期間内に頻回投与した場合、2回目投与時の半減期が著しく低下する Accelerated Blood Clearance phenomenon (ABC現象)が報告されている。そこで、HbV頻回投与時の体内動態について健常マウスを用いて検討を行った。

0.1 mg/kg投与時では初回投与に比べ2回目投与時において血中からの急速な消失が確認され、ABC現象が誘導された(Fig. 6A)。また、各速度論パラメータを算出したところ、半減期は2回目投与時では0.5倍に短縮し(2.7 \pm 0.2 and 1.3 \pm 0.3 hr, $p < 0.05$, for first and second injection, respectively)、それに伴い血中濃度曲線化面積は減少し(27.1 \pm 18 and 4.5 \pm 3.8 hr*% of dose/mL, $p < 0.001$, for first and second injection, respectively)、クリアランスは増大した(3.69 \pm 0.4 and 22.3 \pm 8.1 mL/hr, $p < 0.001$, for first and second injection, respectively)。一方、1400 mg/kg投与時では初回投与・2回目投与間において血中濃度推移の変化は確認されず、ABC現象は誘導されなかった(Fig. 6B)。0.1 mg/kg投与時と同様に各速度論パラメータを算出したところ、初回投与・2回目投与時において半減期、クリアランスは変化しなかったものの(半減期; 18.8 \pm 1.3 and 17.4 \pm 3.9 hr, クリアランス; 0.12 \pm 0.04 and 0.14 \pm 0.05 mL/hr, for first and second injection, respectively)、血中濃度曲線化面積は2回目投与時において有意に減少した(829 \pm 38 and 695 \pm 38 hr*% of dose/mL, $p < 0.05$, for first and second injection, respectively)。