

4. K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Maruyama, M. Otagiri / Pharmacokinetic properties of hemoglobin encapsulated liposome (hemoglobin-vesicle) in a hemorrhagic shock rat model / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29
 5. H. Horinouchi, N. Sasaki, Y. Seishi, K. Kobayashi, H. Sakai. Influence of hemoglobin vesicle on oxygen diffusion constant of arteriolar wall in microcirculation of mouse dorsal skin window chamber / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29
 6. Y. Tomita, M. Unekawa, H. Toriumi, K. Masamoto, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Horinouchi, K. Kobayashi, I. Kanno, N. Suzuki. Effect of injection of artificial RBCs on murine hemorrhagic hypotension model / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29
 7. 堀之内宏久、佐々木信彦、山本尚志、小松晃之、山崎真敬、饗庭了、富田裕、泉陽太郎、山本学、勢司泰久、酒井宏水、小林紘一 / 微小循環と酸素運搬体：酸素治療への展望 / 第18回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.
 8. 勢司泰久、堀之内宏久、酒井宏水、小林紘一 / ラット制御継続出血ショックモデルを用いた生理食塩分散ヘモグロビン小胞体(Hb-vesicles)の検討 / 第18回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.
 9. 藤原満博、東寛、大橋乃理子、酒井宏水、堀之内宏久、小林紘一、池田久實 / ヘモグロビン小胞体のラット免疫能への影響 — 遺伝子発現プロファイルの解析 / 第18回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.
- G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
該当なし

分担研究報告書

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定と GMP 製造技術の確立

分担課題：

- (1) ラット制御継続出血ショックモデルを用いた生理食塩液分散ヘモグロビン小胞体 (Hb-vesicle) による蘇生法の検討
- (2) メチレンブルー及びアスコルビン酸を配合した還元剤適用によるヘモグロビン小胞体 (Hb-vesicle) の機能回復の試み

研究分担者 小林 紘一 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 名誉教授
研究協力者 勢司 泰久 慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター 特任助教

研究要旨

(1) 大量出血に対する輸液蘇生では膠質液成分が重要であるが、今回は生食分散ヘモグロビン小胞体をそのまま使用し、晶質液輸液での蘇生効果を検討した。輸液検体として生食分散ヘモグロビン小胞体、洗浄赤血球生食分散液及び生理食塩液を用意した。Wistar系ラット（雄性、8-9週齢）を用いて制御継続出血ショックモデルを作製し、総出血量に対して3倍量（輸液検体各群1容に対して生理食塩液2容を追加）を輸液した。輸液完了後は麻酔下で1時間安静を保った。その後覚醒させ、蘇生開始後24時間まで観察測定を行った。生理食塩液群の多くが覚醒以前に死亡したが、ヘモグロビン小胞体群及び洗浄赤血球群のほとんどが蘇生開始後24時間以上生存した。ヘマトクリット値は、ヘモグロビン小胞体群及び生理食塩液群の輸液完了時でほぼ生存限界まで低下した。一方、洗浄赤血球群は赤血球供給により上昇に転じたが、生理食塩液に交換した後は低下傾向を示した。血圧推移では、生理食塩液群は蘇生開始後もほとんど上昇しなかったが、ヘモグロビン小胞体及び洗浄赤血球群では上昇し、輸液剤交換後も高値を維持した。血中乳酸値では、生理食塩液群が輸液蘇生200%までは著しく上昇したが、その後、低下傾向に転じた。一方、ヘモグロビン小胞体及び洗浄赤血球群は蘇生開始後に低下傾向へ転じたが、ヘモグロビン小胞体群の脱血終了時及び覚醒観察終盤で上昇傾向が示された。本モデルの様な大量出血、大量投与下では、赤血球喪失と血液稀釈によって、生理食塩液のみでの生命維持は著しく困難であった。しかし、ヘモグロビン小胞体及び洗浄赤血球などの酸素運搬体輸液では、膠質液成分を含まなくても初期の昇圧及び乳酸値抑制などの効果が認められ、酸素供給の重要性が改めて示された。

(2) ヘモグロビン小胞体は赤血球に匹敵する酸素運搬能力を有しているが、生体内で有効に機能する時間をいかに延長するかが課題の一つである。今年度は、還元剤の併用によって酸素運搬能の回復及び維持を試みた。還元剤としてメチレンブルー-アスコルビン酸混合液を選択し、各種の経路から投与を行ったところ、効果発現及び継続時間に差は認められたものの、全ての経路で還元効果が認められた。一方、致死的な水準にまでメトヘモグロビン比率が上昇するヘモグロビン小胞体-血液高度交換モデルに対して、還元剤を適用したところ、代謝の改善が認められ、生存性が向上した。赤血球が有する還元酵素系をヘモグロビン小胞体に再現することは未達成である

が、還元剤の適用にて還元機能を代替することが可能となった。

(1) ラット制御継続出血ショックモデルを用いた生理食塩液分散ヘモグロビン小胞体 (HbV) による蘇生法の検討

A. 研究目的

これまで我々のグループでは、大量輸液を念頭に置いた動物モデルを用いてヘモグロビン小胞体の効果に関する検討を重ねてきたが、ヘモグロビン小胞体は生理食塩液に分散されており、浸透圧維持の観点から、アルブミンやヒドロキシエチルスターチとの混合液、または併用使用することが前提であった。一方、医薬品開発の観点では、薬剤単独の効能及び毒性に関する情報を得ることが重要である。そこで、本年度は臨床試験を想定し、生食分散ヘモグロビン小胞体を直接投与する是非について検討する一環として、ラットに対して膠質成分を用いずにヘモグロビン小胞体を投与した。尚、基本的なモデルとして、ラット50%制御出血ショックモデルを用いた予備検討を実施したところ、比較対照として設定した生理食塩液群（晶質液）では、晶質液成分の血管漏出によって相対的にヘマトクリットが維持された為に決定的な酸素不足に至らず、対照として不適當であることが判明した。また、昨年度に使用したラット制御不能尾動脈出血モデルでは、生理食塩液群の多数が致死したものの、出血量を制御しない為に個体差が拡大することが問題であった。そこで、本年度は、出血量の機械的制御と輸液を同時に行うことで、残存赤血球を減少させた。

B. 研究方法

1. 群構成及び検体調製

群構成は生理食塩液、ヘモグロビン小胞体生食分散液、洗浄赤血球生食分散液及び生理食塩液を輸液検体とする3群とし、1各群6例、計18例で実施した。

ヘモグロビン小胞体生食分散液はニプロ株式会

社にて委託製造し、生理食塩液は市販局方製剤を使用した。洗浄赤血球生食分散液は、ヘパリン加同種血液を遠心分離（4℃、2000g×15分）して血漿及びバフィーコートを除去した後、生理食塩液を加えて2回洗浄して得られた赤血球に生理食塩液を加え、ヘモグロビン小胞体と同程度のヘモグロビン含量（Hb=10.0±0.5g/dL）に調製した。

2. 試験系及び外科処置

Wistar系、雄性ラット（体重337.1±15.4g）を用い、セボフルラン麻酔の自発吸入下にて外科処置及び出血ショック蘇生を実施した。外科処置として、頸動脈及び大腿動脈にポリエチレンカテーテルを挿管し、尾静脈に留置針を刺入した。これらの内、大腿動脈を麻酔下での血圧測定、尾静脈を輸液経路とした。一方、頸動脈カテーテルは皮下を經由して頸背部より体外へ誘導し、脱血及び採血に使用した。更に、覚醒処置の際に、採血/血圧ポートへ加工し、動物行動の自由を確保した。

3. 出血ショック惹起及び輸液蘇生 (Fig. 1)

ラットの循環血液量を56mL/kgとして、頸動脈から速度28mL/kg/hrで1時間脱血し、循環量の50%を脱血した。更に、脱血を継続しながら、輸液検体を速度56mL/kg/hrで1時間点滴注入した。ここで脱血を終了し、各群の輸液検体を生理食塩液へ変更して2時間点滴注入した。総注入量は脱血量の3倍に達した。その後、麻酔下で1時間静置し、カテーテル除去、採血ポート加工を施して覚醒させた。

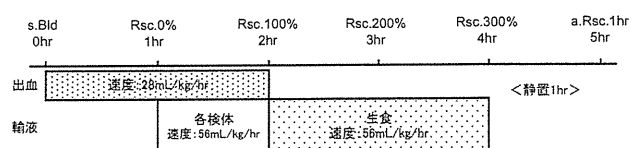


Fig. 1 出血ショック惹起と蘇生法

4. 観察及び測定

測定項目は輸液蘇生開始後の生存時間（最長24時間）、平均動脈血圧、ヘマトクリット値（マイクロヘマトクリット法）、血中乳酸値、Base excess, pH、動脈血二酸化炭素分圧、動脈血酸素分圧及び電解質（Ca²⁺, K⁺, Cl⁻, Na⁺）とし、脱血開始前（Pre）、輸液開始（Rsc.0%）、50%輸液（Rsc.50%）、100%輸液（Rsc.100%）、200%輸液（Rsc.200%）、300%輸液到達（Rsc.300%）、輸液終了後1時間（a.Rsc.1hr）、覚醒後4時間（a.Awk.4hr）、10時間（a.Awk.10hr）、16時間（a.Awk.16hr）及び輸液開始後24時間（s.Rsc.24hr）の11時点に測定した。

得られたデータは、可能な限り、多群間検定による統計処理を行った（P = 0.05）。

C. 結果

1. 生存分析 (Fig. 2)

生理食塩液群は多数が麻酔期間中に死亡し、蘇生開始後24時間の生存を達成する個体は現れなかった。一方、ヘモグロビン小胞体群は5/6例、赤血球群は全例が蘇生開始後24時間の生存を達成し、生理食塩液群との間に有意差が認められた。また、ヘモグロビン小胞体群の1例が早期に死亡したが、洗浄赤血球群との間に有意差は認められなかった。

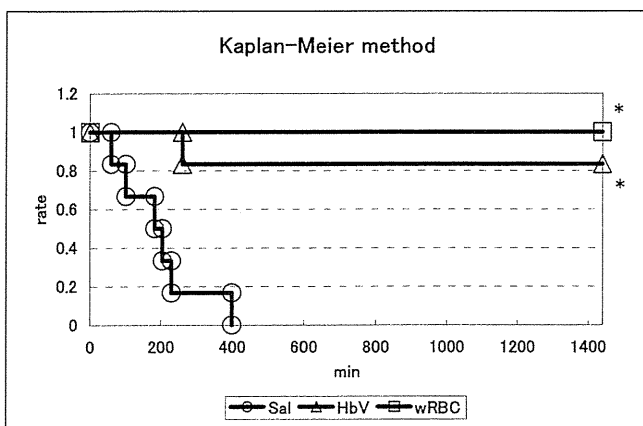


Fig. 2 Survival curve, *: v.s. Sal (P<0.05)

2. ヘマトクリット及び平均動脈血圧(Fig. 3)

ヘマトクリット推移では、循環量50%脱血によって、

各群とも約30%まで低下した。各検体での輸液蘇生を開始したところ、ヘモグロビン小胞体群及び生理食塩液群では、同様の低下傾向を示し、3倍量輸液終了時点で約12%に達した。一方、洗浄赤血球群は赤血球供給に伴い、上昇に転じたが、輸液剤を生理食塩液へ交換した後は再び低下傾向に推移した。覚醒後の推移では、ヘモグロビン小胞体群は僅かに低下傾向を示したが、洗浄赤血球群は覚醒初期に著しく減少し、その後、緩やかな低下へ変化した。

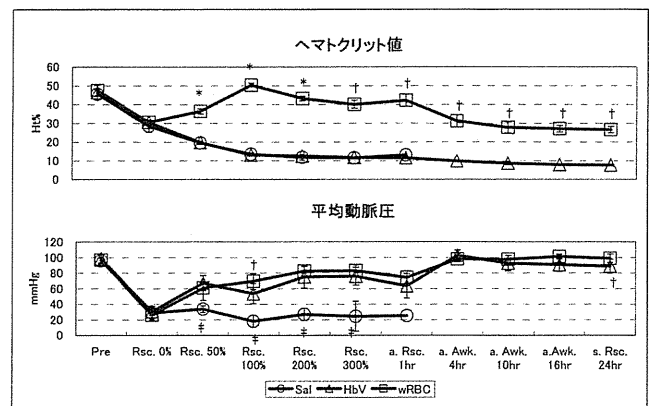


Fig.3 Hematocrit and Mean arterial pressure, *: wRBC v.s. Sal and HbV, †: HbV v.s. wRBC, ‡: Sal v.s. HbV and wRBC (P<0.05)

平均動脈血圧推移では、50%脱血の結果、各群とも約30mmHgまで低下したが、輸液開始によって、ヘモグロビン小胞体群及び洗浄赤血球群が上昇へ転じ、覚醒後はほぼPre値水準まで回復した。一方、生理食塩液群はヘマトクリットがヘモグロビン小胞体群と同等であるにも関わらず、低値に推移し、5/6例が麻酔期間中に死亡した。

3. 血中乳酸値、ベースエクセス及びpH (Fig. 4)

血中乳酸値は、50%脱血時点で各群とも5-6mmol/L程度まで上昇したが、ヘモグロビン小胞体群及び洗浄赤血球群では脱血継続中にも関わらず輸液開始によって低下傾向に転じた。その後、ヘモグロビン小胞体群では、脱血終了時及び蘇生終了後24時間に多少の上昇が認められたが、生食への輸液剤変更以降は概ね低下傾向を示した。洗

浄赤血球群は、脱血終了及び輸液剤交換に関係なく、低下傾向を示した。一方、生理食塩液群では輸液開始後も上昇傾向を示し、200%輸液時点でピークを迎えたが、その後は低下傾向に転じ、覚醒早期に全例が致死した。

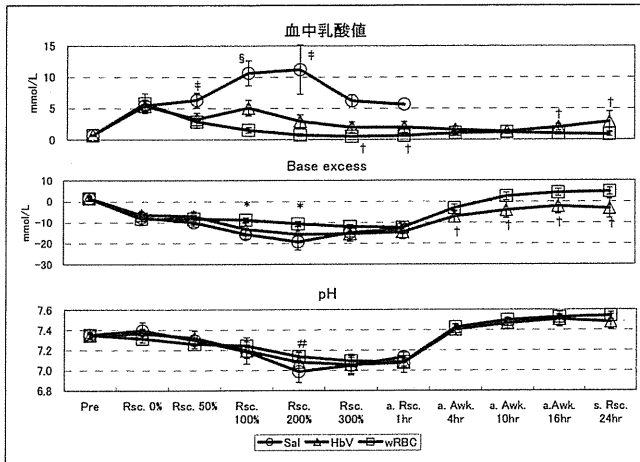


Fig. 4 Lactate, Base excess and pH, *: wRBC v.s. Sal and HbV, †: HbV v.s. wRBC, ‡: Sal v.s. HbV and wRBC, §: Sal v.s. HbV v.s. wRBC, #: Sal v.s. wRBC (P<0.05)

ベースエクセスでは、50%脱血によって各群ともマイナスを示し、麻酔期間中は低値のまま推移した。100%輸液及び200%輸液時点ではヘモグロビン小胞体群及び生理食塩液群と洗浄赤血球群の間に有意差が認められたが、輸液終了後1hr (麻酔下) では3群ともほぼ同等の値を示した。覚醒後では、ヘモグロビン小胞体群と洗浄赤血球群は共に回復傾向に転じたが、両群間には有意差が認められた。

pHでは、各群とも麻酔期間中は低下、覚醒後は回復傾向を示し、200%輸液時点で洗浄赤血球群と生理食塩液群の間に有意差が認められたものの、総じて3群とも類似の推移であった。

4. 動脈血二酸化炭素分圧及び酸素分圧 (Fig. 5)

二酸化炭素分圧では、各群とも50%脱血によって低下したが、輸液開始によって上昇に転じ、麻酔期間中は上昇傾向に推移した。ヘモグロビン小胞体群と洗浄赤血球群はほぼ同等の推移であったが、

生理食塩液群は若干低値であり、200%輸液時点で洗浄赤血球群との間に有意差が認められた。覚醒後では、洗浄赤血球群は生理値付近で安定推移したものの、ヘモグロビン小胞体群が若干低値となり、一部で有意差が認められた。

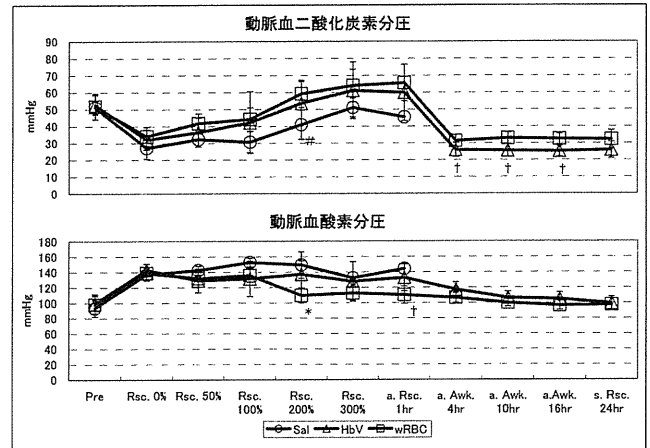


Fig. 5 Arterial blood pCO₂ and pO₂, *: wRBC v.s. Sal and HbV, †: HbV v.s. wRBC, #: Sal v.s. wRBC (P<0.05)

酸素分圧では、50%脱血により3群とも増加傾向を示したが、輸液開始によってヘモグロビン小胞体群は若干低下して安定、洗浄赤血球群は脱血停止で更に低下して安定となったが、生理食塩液群は比較的高値のまま推移した。覚醒後では、ヘモグロビン小胞体群及び洗浄赤血球群共に経時的に生理値付近まで低下傾向を示し、輸液開始後24時間で回復した。

5. カルシウム、カリウム、塩素及びナトリウムイオン (Fig. 6)

麻酔期間生食200%輸液中のカルシウムイオン濃度では、洗浄赤血球群及び生理食塩液群がほぼ同様の推移を示したのに対し、ヘモグロビン小胞体群は有意な低値を示した。また、覚醒後では、ヘモグロビン小胞体群及び洗浄赤血球群とも脱血開始前 (Pre) よりも低値推移を示した。しかし、何れの変化も僅かな範囲に留まっていた。

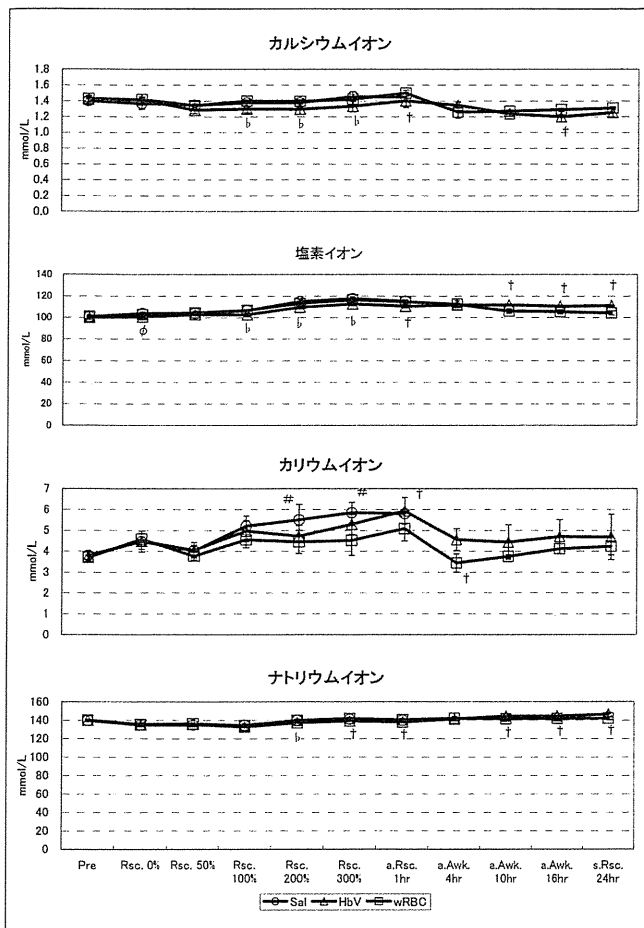


Fig. 6 Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Na^+ , †: HbV v.s. wRBC, #: Sal v.s. wRBC, ‡: HbV v.s. Sal and wRBC, φ: Sal v.s. HbV ($P < 0.05$)

麻酔期間のカリウムイオンでは、各群とも脱血開始前よりも高値傾向となり、輸液終了後1時間で全群が5mmol/L以上となった。しかし、覚醒後は、ヘモグロビン小胞体群が約4.5、洗浄赤血球群が3.5-4.0mmol/L程度にまで低下し、生理的範囲に回復した。

塩素イオン及びナトリウムイオンでは、ヘモグロビン小胞体群の生食輸液時が他2群と比較してより低値を示したが、覚醒後は、逆に洗浄赤血球群よりも高値に推移した。しかし、何れの変化も僅かな範囲に留まっていた。

D. 考察

晶質液輸液による出血性ショック蘇生を念頭に、

生食分散ヘモグロビン小胞体を含む大量輸液による蘇生について検討したところ、生理食塩液のみで蘇生した群は全例が早期に致死したのに対して、ヘモグロビン小胞体あるいは洗浄赤血球による輸液を適用した群では、輸液蘇生後24時間以上の生存を達成する個体が現れ、生存性向上が確認された。

一般に、晶質液による輸液蘇生では晶質液の血管外漏出による循環血液量減少並びに血圧低下を抑制する目的で出血量の3倍に相当する容量の注入が必要とされており、本検討も脱血操作及び各検体輸液終了後に総循環量の2倍に相当する生理食塩液を輸注している。この時点では、生理食塩液蘇生群もヘマトクリットは12%程度を維持しており、多少の酸素不足を来たすものの、致死的な水準ではない。しかし、生理食塩液のみの輸液蘇生では、輸蘇生開始時の血圧を維持するが、昇圧することは出来ず、更に乳酸値上昇やベースエクス低下を招くなど重度の酸素不足による代謝異常を呈して死亡した。一方、ヘモグロビン小胞体を含む輸液蘇生では、輸液開始直後から血圧上昇が認められ、覚醒後では、代謝関連の指標も含め、ほぼ生理的水準まで回復した。欧米にて開発されたヘモグロビン由来人工酸素運搬体における問題の一つとして、遊離ヘモグロビンのNO捕捉を主因とする血管収縮によって著しい血圧上昇を生じることが知られているが、ヘモグロビン小胞体群の血圧推移は洗浄赤血球群とほぼ同等であり、本邦で開発された細胞型人工酸素運搬体の優位性が示された。

ヘモグロビン小胞体と生理食塩液の併用に関して、血圧、乳酸値、pH、二酸化炭素分圧などは麻酔期間及び覚醒期間を通じて洗浄赤血球群とほぼ同様の推移を示しており、同程度のヘモグロビン濃度を有してれば、著しい悪影響は出現し無い様である。一方、動脈血酸素分圧についてはヘモグロビン小胞体群の生食輸液期間が、洗浄赤血球群の推移から解離しており、最終的には同水準とな

るものの、脱血に伴う酸素分圧上昇からの回復に多少の遅れが認められる。また、電解質については、ヘモグロビン小胞体群と洗浄赤血球群の間で、カルシウム、塩素及びナトリウムイオンで、麻酔期間中と覚醒期間中の推移が微量ながら異なっており、臨床への影響について更に精査する必要があると認められた。カリウムイオンに関しては、ヘモグロビン小胞体群が洗浄赤血球群よりも若干高値に推移したが、同様の挙動である上に、個体差が大きいことから、影響は少ないと考えられた。

E. 結論

生食分散ヘモグロビン小胞体による大量晶質液輸液蘇生では、電解質バランスに多少の影響が認められるものの、赤血球と同程度の血圧上昇効果や乳酸値上昇抑制効果が認められ、生存性が向上するなど、出血性ショックに対して十分な効果を示したことから、単体でも輸液蘇生剤として有効であり、重篤な悪影響を及ぼさないと結論された。

(2) メチレンブルー及びアスコルビン酸を配合した還元剤適用によるヘモグロビン小胞体の機能回復の試み

A. 研究目的

これまで、各種出血ショックモデルや血液交換モデルを用いて、大量使用時においてもヘモグロビン小胞体には赤血球に匹敵する蘇生効果があることを示してきた。しかしヘモグロビン小胞体は製造過程において赤血球膜に存在する還元系を失う為、赤血球に比べてヘモグロビンが早期にメトヘモグロビンへ変化してしまい、酸素運搬機能を発揮できる時間が著しく短くなることが問題であった。この課題を解決する一つの方法として、未劣化ヘモグロビン小胞体を点滴投与することで出血ショック惹起から24時間の生存が可能になることを昨年報告した。しかし、その方法では、生存時間の延長に伴って、血管内のヘモグロビン濃度が著しく上昇するな

ど、血行動態に悪影響を与えることが予測されており、根本的な解決には程遠いのが状況である。一方、ヘモグロビン小胞体に還元系を組み込む試みは、以前より継続されており、一定の成果を上げているものの、未だ製剤としては未完成である。

そこで、今年度はヘモグロビン小胞体と既に臨床使用例のある還元剤を生体内で反応させることによって、酸素運搬能が低下したヘモグロビン小胞体の機能を回復させる方法について検討した。

B. 研究方法

1. 高 MetHb 含有ヘモグロビン小胞体の大量投与によるラット高メトヘモグロビン血症モデルを用いた予備検討

還元剤の効果を確認する為に、各群少数例による以下の予備検討を実施した。

(1)試験系

8-9 週齢の Wistar 系雄ラット (体重約 350g) に高濃度のメトヘモグロビン (47.7-90.2%, 平均 78.7%) を含む劣化ヘモグロビン小胞体を容量 28mL/kg (11 例) または 56mL/kg (1 例), 速度 28mL/kg/hr で点滴静脈内投与した。更に 1 時間麻酔下にて静置して状態を安定化し、メトヘモグロビン血症モデルを作製した。

(2)還元剤投与

少数例での予備検討として、メチレンブルー水溶液 (0.03%), アスコルビン酸水溶液 (1%), メチレンブルーとアスコルビン酸の混合水溶液及び局方蒸留水を用意し、覚醒後の動物へ胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与容量は 5mL/kg×3 回 (覚醒直後, 覚醒後 1 及び 3 時間) とした。更に、メチレンブルー-アスコルビン酸混合液については、生理食塩液に溶解した検体を調製し、静脈内投与 (容量 3mL/kg/hr×5hr, 麻酔下にて実施), 皮下投与 (容量 15mL/kg) 及び腹腔内投与 (容量 15mL/kg) を試みた。

(3)観察・測定

メトヘモグロビン血症モデル作製中を含め、還元剤投与開始後 24 時間まで経時的に採血を行い、血液ガス分析装置にてメトヘモグロビン比率を測定した。

2. ラット高度血液交換モデルを用いた還元剤投与の効果

メチレンブルー-アスコルビン酸混合液の経口投与によるメトヘモグロビン還元効果を確認する為に、血液交換法を用いて、ヘモグロビン小胞体による高度血液置換を課したモデルを作製した。

(1)群構成、輸液剤及び投与検体調製

群構成は、ヘモグロビン小胞体を含む輸液剤で血液交換し、還元剤を経口投与した群 (HbV+Rd 群, n=6)、ヘモグロビン小胞体を含む輸液剤で交換し、生理食塩液を経口投与した群 (HbV+Sal 群, n=5) 及び洗浄赤血球を含む輸液剤で交換し、還元剤を経口投与した群 (wRBC+Rd 群, n=5) の 3 群とし、計 16 例で実施した。

ヘモグロビン小胞体生食分散液はニプロ株式会社にて委託製造し、等量のヒドロキシエチルスターチ (HES; サリンヘス®, フレゼニウスカービジャパン株式会社) と混合して交換輸液に供した。また、洗浄赤血球生食分散液は、ヘパリン加同種血液を遠心分離 (4℃, 2000g×15 分) して血漿及びバフィーコートを除去した後、生理食塩液を加えて同様に 2 回洗浄し、洗浄後の赤血球に生理食塩液を加えてヘモグロビン小胞体と同程度のヘモグロビン含量 (Hb=10.0±0.5g/dL) に調製した。更に等量の HES と混合して交換輸液に供した。

還元剤は、メチレンブルー 0.14% 及びアスコルビン酸 2.0% の濃度に調製した。即ち、動物用医薬品の 0.82% メチレンブルー水溶液 1.710mL 及び日本薬局方ビタミン C 原末 0.200g を秤量し、日本薬局方生理食塩液を総量 10.0g まで加えて溶解した。更

に、0.20µm フィルタにて濾過滅菌し、経口投与に供した。

(2)試験系及び外科処置

Wistar 系、雄性ラット (体重 337.9±14.4g) を用い、セボフルラン麻酔の自発吸入下にて外科処置及び血液交換を実施した。外科処置として、頸動脈及び大腿動脈にポリエチレンカテーテルを挿管し、尾静脈に留置針を刺入した。これらの内、大腿動脈を脱血及び麻酔下採血経路、尾静脈を輸液経路とした。一方、頸動脈カテーテルは皮下を經由して頸背部より体外へ誘導し、血圧測定及び覚醒下採血経路に使用した。更に、血液交換終了後に大腿動脈及び尾静脈から抜管及び閉創し、頸動脈カテーテルを採血/血圧ポートへ加工して覚醒後の測定、採血及び行動の自由を確保した。尚、外科処置中を含めて経口投与初回 (血液交換終了後 12 時間) までに 5/21 例が死亡したが、モデル形成失敗と判断して除外し、16 例を試験系として採用した。

(3)血液交換 (Fig. 1)

脱血及び輸液速度は 56mL/kg/hr に設定した。動物の自己赤血球を十分に排除し、且つ、ヘモグロビン小胞体の消費量を抑制する為、血液交換を 3 段階に分けて実施した。即ち、第 1 段階では、1.5 時間に渡り、84mL/kg の HES と等量交換を課した。第 2 段階では、脱血を継続したまま、輸液剤をヘモグロビン小胞体-HES 混合液または、洗浄赤血球-HES 混合液へ変更し、同時交換を 1 時間継続した。第 3 段階では、脱血を停止し、輸液剤のみを 1 時間継続注入した。尚、外科処置終了後に、血液交換中の凝固防止の目的でヘパリンナトリウム 500U/body を輸液経路から投与し、全身をヘパリン化した。

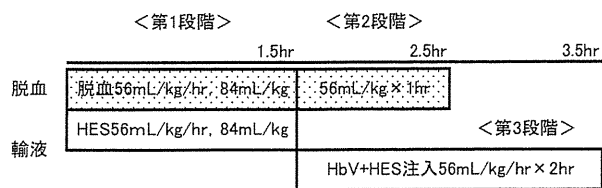


Fig. 1 血液交換法

(4)還元剤投与

血液交換終了後 12, 18 及び 24 時間の観察測定終了後に、小動物用胃ゾンデを用いて強制経口投与した。即ち、HbV+Rd 群及び wRBC+Rd 群にメチレンブルー-アスコルビン酸混合液を、HbV+Sal 群に生理食塩液を適用した。投与容量は各回とも 5mL/kg, 合計で 15mL/kg とした。

(5)観察及び測定

測定項目は血液交換終了後の生存時間（最長 48 時間）、心拍数、平均動脈血圧、ヘマトクリット値（マイクロヘマトクリット法）、Base excess, 血中乳酸値, pH, ヘモグロビン濃度, メトヘモグロビン比率及び電解質 (Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , Na^+) とし、交換開始前 (Pre), 輸液剤交換 (c.Fid), 脱血終了 (e.Bld), 輸液終了 (e.Trf), 交換終了後 6 時間 (a.Exc6hr), 12 時間 (a.Exc12hr), 18 時間 (a.Exc18hr), 24 時間 (a.Exc24hr) 及び 48 時間 (a.Exc48hr) の計 9 時点に実施した。尚、全例とも交換終了後 24 時間まで 1 時間毎に生存確認を行い、状態悪化例については 24 時間以降も頻繁な生存確認を行った。

得られたデータは、HbV+Rd 群及び HbV+Sal 群間あるいは、HbV+Rd 群及び wRBC+Rd 群間について、それぞれ 2 群間検定による統計処理 ($P=0.05$) を行った。尚、生存時間については死亡発見時に死後硬直が認められた個体は直近の生存確認時刻、硬直が認められなかった個体は発見時刻に基づいて生存時間を算出し、統計処理を施した。また、心拍数、平均動脈圧及び電解質については、交換開始前、輸液終了、交換終了後 24 及び 48 時

間の 4 時点の評価した。

C. 結果

1. 高 MetHb 含有ヘモグロビン小胞体の大量投与によるラット高メトヘモグロビン血症モデルを用いた予備検討

(1)ヘモグロビン小胞体大量投与の影響 (Table 1)

56mL/kg のヘモグロビン小胞体浮遊液 (HbV) を点滴静注したところ、注入前と注入後 1 時間のヘマトクリット値 (Ht) は変化が少なく、ヘモグロビン小胞体液の晶質液成分は速やかに血管外へ漏出することが認められた。また、ヘモグロビン量 (Hb) は注入量に応じて増加した。しかし、還元剤投与後 24 時間では、ヘマトクリット値及びヘモグロビン量が共に低下しており、網内系でのヘモグロビン小胞体捕捉の他、間質液の血管内再流も生じていた。一方、28mL/kg のヘモグロビン小胞体を静注した場合でも同様の傾向が認められており、ヘモグロビン小胞体の大量投与は循環量過多を招くことが判明した。

Table 1. HbV注入モデルの特性(平均±標準偏差)

HbV点滴静注量	例数	単位:	Ht %	Hb g/dL
28mL/kg/hrX2hr (56mL/kg)	1	注入前	46	15.3
		注入後1hr	42	22.4
		還元開始後24hr	32	17.8
28mL/kg/hrX1hr (28mL/kg)	11	注入前	45.0±1.7	15.0±0.6
		注入後1hr	39.5±2.3	17.2±0.8
		還元開始後24hr	35.1±2.1	15.6±0.6

(2)還元剤投与の効果 (Fig. 2)

経口投与した群では、蒸留水投与 (DW/PO) で、経口投与後 5 時間にメトヘモグロビンの急増が認められた後、24 時間で若干低下した。アスコルビン酸投与 (AA/PO) では、僅かながら経時的な増加が認められた。また、メチレンブルー投与 (MB/PO) では、僅かながら、経時的な低下が認められたものの、ヘモグロビン量の推移 (Table 1) から、ヘモグロビン小胞体の網内系捕捉によるメトヘモグロビンの減少によるものである可能性が高く、還元効果があるとは認められなかった。一方、

メチレンブルー-アスコルビン酸混合液投与 (MA/PO) では、経口投与開始後 5 時間以降にメトヘモグロビン比の顕著な低下が認められた。

続いて、メチレンブルー-アスコルビン酸混合液を静脈内点滴投与 (MA/IV)、皮下投与 (MA/SC) 及び腹腔内投与 (MA/IP) したところ、いずれの経路においてもメトヘモグロビン比の急速な低下が確認されたが、還元剤投与開始後 24 時間では再上昇が認められたことから、経口投与と比較して即効性があるものの、効果の持続時間が短いことが判明した。

以上の如く、メチレンブルー-アスコルビン酸混合液には、メトヘモグロビン比率を低下させる効果が認められた。しかし、ヘモグロビン小胞体大量投与モデルには十分な自己赤血球が残存している為、酸素運搬に関する知見を得ることは出来なかった。

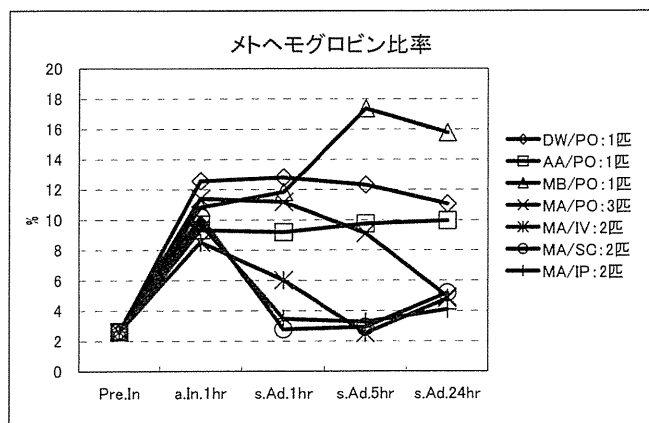


Fig. 2 Rate of methemoglobin

2. ラット高度血液交換モデルを用いた還元剤投与の効果

(1) 生存性 (Fig. 3)

HbV+Rd 群では、4/6 例 (66.7%) が交換終了後 48 時間以上生存した。一方、Hbv+Sal 群では、5 例全例が 48 時間以内に死亡した。また、wRBC+Rd 群は 5 例全例が 48 時間以上生存した。尚、HbV+Rd 群での死亡 2 例は発見時に死後硬直が認められており、直近の生存確認時刻を死亡時刻とした為、実際よりも短縮された生存時間を採用した。

生存時間についてログランク検定を行ったところ、

HbV+Rd 群と HbV+Sal 群の間に有意差が認められた ($P=0.0478$)。一方、HbV+Rd 群と wRBC+Rd 群の間に差は認められなかった ($P=0.1766$)。

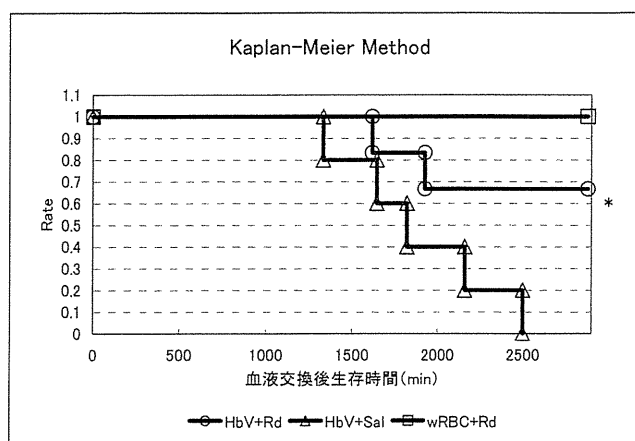


Fig. 3 Survival, *: HbV+Rd vs. HbV+Sal ($P = 0.05$)

(2) ベースエクセス、血中乳酸値及び pH (Fig. 4)

ベースエクセスでは、各群とも交換輸液終了時 (e.Trf) まで低下傾向にあったが、覚醒により上昇、生理値への回復傾向を示した。HbV+Rd 群は交換終了後 24 時間 (a.Exc24hr) までは安定して推移したものの、48 時間に低下を示した。HbV+Sal 群は 18 時間まで HbV+Rd 群と同等の推移を示したが、24 時間では HbV+Rd 群に対して有意な低値を示し、48 時間までに全例が死亡した。wRBC+Rd 群は HbV+Rd 群に対して脱血終了 (e.Bld) から交換終了後 6 時間まで有意な低値を示したが、以降 24 時間までは同等に推移し、48 時間では有意な高値を示した。

血中乳酸値では、各群とも輸液剤交換時 (c.Fld) に高値傾向を示したが、交換終了時には生理値付近まで回復し、その後 12 時間までは概ね安定推移した。HbV+Rd 群は 24 時間までほぼ一定であったが、48 時間では若干上昇した。HbV+Sal 群は HbV+Rd 群に対して輸液交換時に有意な高値を示した他、18 及び 24 時間に有意な高値を示した。wRBC+Rd 群は HbV+Rd 群に対して 18 時間に有意な低値を示したが、24 及び 48 時間まで安定して推移した。

pH では、各群とも輸液終了時まで低下傾向を示

したが、覚醒後は生理値よりも若干高値で安定推移した。HbV+Rd 群及び HbV+Sal 群はほぼ同等に推移したが、wRBC+Rd 群は HbV+Rd 群に対して脱血終了時、輸液終了時、交換後 6 及び 24 時間で有意な低値を示した。

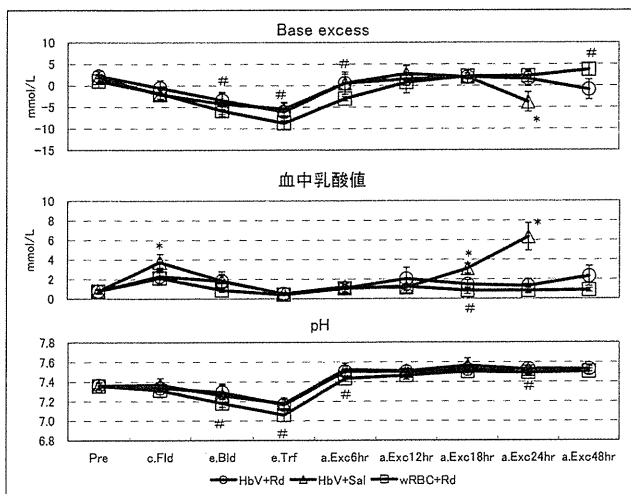


Fig. 4 Base excess, lactate and pH, *: HbV+Rd vs. HbV+Sal, #: HbV+Rd vs. wRBC+Rd (P = 0.05)

(3)ヘマトクリット、ヘモグロビン濃度及びメトヘモグロビン比率 (Fig. 5)

ヘマトクリット値では、各群とも輸液剤交換時 (c.Fld) に 6-7%まで低下した。HbV+Rd 群及び HbV+Sal 群はその後も低下し、交換終了時 (e.Trf) では 1.5%程度を示した。以降は僅かに上昇傾向に転じ、24 時間 (a.Exc24hr) で 3.5%程度、48 時間で 6%程度まで上昇した。wRBC+Rd 群は輸液剤交換後に上昇へ転じ、6 時間で 30%程度に達した後は、ほぼ安定推移した。また、脱血終了以降は HbV+Rd 群に対して全て有意な高値を示した。

ヘモグロビン濃度では、各群とも輸液剤交換時に低値を示したが、その後は上昇し、6 時間で 10g/dL 程度となった。HbV+Rd 群では 6 時間以降で徐々に低下し、48 時間では 6g/dL 程度を示した。HbV+Sal 群では HbV+Rd 群と同様に僅かな低下傾向を示したが、18 及び 24 時間では HbV+Rd 群に対して僅かであるが有意な高値を示した。wRBC+Rd 群は HbV+Rd 群に対して脱血終了及び輸液終了時に有意な低値を示したが、12 時間以降

は僅かであるが、有意な高値を示した。

メトヘモグロビン比率では、HbV+Rd 群及び HbV+Sal 群で輸液剤交換後に 10%弱まで増加し、その後 12 時間で 30%強まで上昇した。18 時間以降では、HbV+Rd 群は経口投与により低下傾向へ転じたが、HbV+Sal 群はそのまま上昇を続け、HbV+Rd 群に対して有意な高値を示した。wRBC+Rd 群は交換輸液開始前から、ほとんど変化せず、HbV+Rd 群に対して輸液剤交換後は全て有意に低値であった。

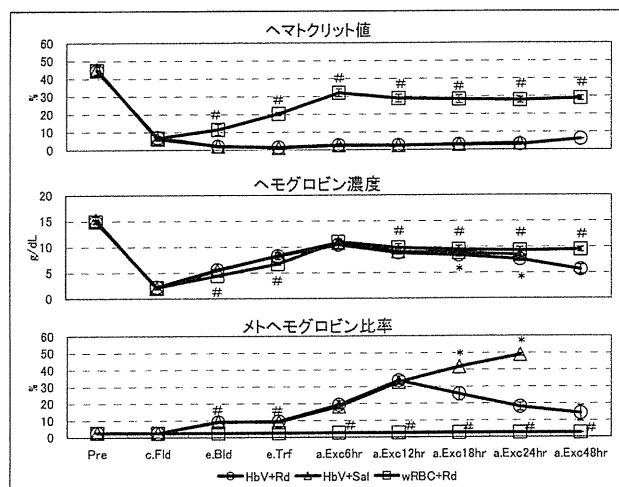


Fig. 5 Hematocrit, Hemoglobin and Methemoglobin, *: HbV+Rd vs. HbV+Sal, #: HbV+Rd vs. wRBC+Rd (P = 0.05)

(4)血行動態 (Fig. 6)

心拍数では、各群とも交換輸液終了時 (e.Trf) に低値を示したが、覚醒後は上昇し、24 時間 (a.Exc24hr) までにはほぼ生理値へ回復した。また、平均動脈血圧では、各群で多少の動揺が認められたものの、48 時間まで、致命的な低下または上昇は認められなかった。その他、幾つかの時点で HbV+Rd 群と wRBC+Rd 群の間に有意差 (P < 0.05) が認められたが、生理的な範囲での変動や極端な数値を示した個体の影響であるなど生物学的意義に乏しい差であった。

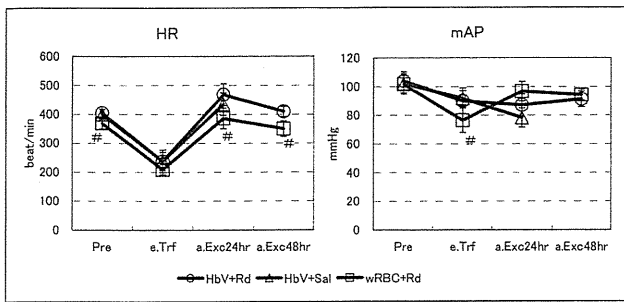


Fig. 6 Heart rate and Mean arterial pressure, #: HbV+Rd vs. wRBC+Rd (P = 0.05)

(5)電解質 (Fig. 7)

カルシウムイオン, カリウムイオン, 塩素イオン, ナトリウムイオンの何れも多少の動揺は認められるものの, 各群に特徴的な変動は認められなかった. 塩素イオンの一部で HbV+Rd 群と wRBC+Rd 群の間に有意差 (P < 0.05) が認められたが, 非常に僅かな差であり, 生物学的意義に乏しい差であった.

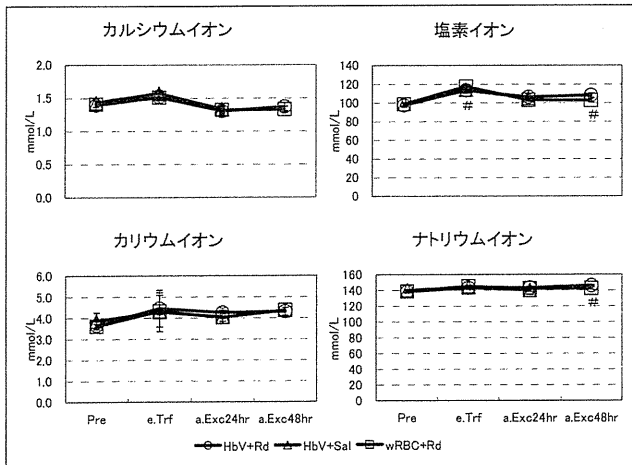


Fig. 7 Electrolyte, #: HbV+Rd vs. wRBC+Rd (P = 0.05)

D. 考察

還元剤の投与によるメト化劣化したヘモグロビン小胞体の酸素運搬機能回復に関して実験を行ったところ, メチレンブルーとアスコルビン酸を混合した投与剤においてメトヘモグロビンの還元及び酸素運搬機能の回復が確認された.

メチレンブルー及びアスコルビン酸はメトヘモグロビン血症の治療薬として古くから知られており, 赤血球に対しては経口摂取または静脈内投与である程度の効果が認められている. しかし, 今回,

メト化ヘモグロビン小胞体の大量輸注によるメトヘモグロビン血症モデルに対して, 強制経口投与にて効果を検討したところ, メチレンブルー及びアスコルビン酸は単独ではほとんど効果が無かったものの, 混合することによって著しい還元効果を示すことが認められた. 更に, 経口投与に限らず, 静脈内, 皮下及び腹腔内投与など各種の投与経路でも十分な効果が認められ, 状況に応じた運用が可能であることが判明した. 一方, 静脈内, 皮下及び腹腔内投与では経口投与よりも即効性があるものの, 効果継続時間が短いことが示された.

続いて, 致死的なメトヘモグロビン血症を誘発する為に, 血液交換法を用いて高度の血液置換を課したモデルに対してメチレンブルー-アスコルビン酸混合還元剤を経口投与したところ, 血液交換終了後 48 時間の時点で, 生理食塩液投与による対照群に対して有意な生存性向上が認められた. 更に洗浄赤血球で置換した群との間には有意差が認められておらず, 還元されたヘモグロビン小胞体でも赤血球に匹敵する生存効果が示された.

先年にて報告されている如く, 正常なヘモグロビン小胞体は赤血球に匹敵する酸素運搬性能を有している為, 還元剤を投与しなかった場合でも, 24 時間以上の生存を達成する個体が現れた. しかし, 還元剤投与無しで 48 時間生存を到達する個体は認められなかった. 代謝関連の指標では, 生存中の pH はあまり変化しなかったものの, 乳酸値が 18 時間で上昇し始め, 24 時間では顕著な高値となった. また, ベースエクセスが 24 時間で負数を示し, 代謝性アシドーシスの存在が示唆されるなど, 比較的長時間生存した個体であっても, 還元剤投与群と比較して明らかに予後不良である.

一方, 還元剤投与群にも 48 時間生存を達成できなかった個体が認められた. また, 生存例においても 48 時間時点の代謝関連指標は還元剤無投与群での 24 時間時点より軽度であったが, 代謝性アシドーシスの進行が示唆されている. しかし, 24 から 48 時間にかけてのメトヘモグロビン比率は, 還元

剤を投与しなかった群と異なって低下している為、還元剤の効果が継続中であると考えられる。更に、ヘマトクリット値上昇及びヘモグロビン濃度低下を生じていることから、状態が良好であるが故に、網内系へのヘモグロビン小胞体補足が亢進し、酸素運搬量が致死量まで減少したことが推察される。これらの問題については、還元剤の配合用量並びに投与方法の最適化及びヘモグロビン小胞体の追加輸注などによって充分解決可能であると考えられる。

その他の項目について、血行動態及び電解質の推移では各群で多少の変動が認められたものの、致命的と考えられる変化に乏しいことから、瀕死または死亡直前まで顕著な変化は生じ難く、ヘモグロビン小胞体の酸化劣化及び還元状態の指標に限ってはあまり有効ではないと考えられる。

E. 結論

メチレンブルー及びアスコルビン酸を配合した還元剤の投与は、輸液後に生じるヘモグロビン小胞体の酸化劣化（メト化）に対して、酸素運搬機能を回復させる効果があり、ヘモグロビン小胞体の機能的寿命を延長させることで更なる生存時間の延長効果を示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

- 10.H. Sakai, N. Miyagawa, H. Horinouchi, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Intravenous injection of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) after hemodilution with a series of plasma expanders (water-soluble biopolymers) in a rat repeated hemorrhage model. *Polymers Adv. Technol.* 22, 1216-1222 (2011)
- 11.K. Taguchi, S. Ogaki, H. Watanabe, D. Kadowaki, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, T. Maruyama, M. Otagiri. Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles prevents *Esherichia coli* growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 337, 201-208 (2011)
- 12.D. Takahashi, H. Azuma, H. Sakai, K. Sou, D. Wakita, H. Abe, M. Fujihara, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Nishimura, H. Ikeda. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive in ex vivo culture condition. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 337, 42-49 (2011).
- 13.H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Hemoglobin vesicle as an effective blood substitute and its removal from circulating blood. *Artif. Organs* 36, 202-209 (2012)
- 14.M. Yamamoto, H. Horinouchi, Y. Seishi, N. Sato, M. Itoh, K. Kobayashi, H. Sakai, Fluid resuscitation of hemorrhagic shock with Hemoglobin vesicles in Beagle dogs: pilot study. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* 40, 179-195 (2012)
- 15.Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, K. Kobayashi. Effect of the cellular-type artificial oxygen carrier Hb-vesicle as a resuscitative fluid for pre-hospital treatment: Experiments in a rat uncontrolled hemorrhagic shock model. *Shock* (in press)
- 16.H. Sakai, S. Takeoka, K. Kobayashi. Gas bioengineering using hemoglobin-vesicles for versatile clinical application. *Current Pharmaceut. Design* 17, 2352-2359 (2011).
- 17.H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi.

Hemoglobin-vesicles as a cellular type hemoglobin-based oxygen carrier. In: Chemistry and Biochemistry of Oxygen Therapeutics: from Transfusion to Artificial Blood. (Ed. by S. Bettati and A. Mozzarelli), Chapter 27, pp.381-390. John Wiley & Sons (2011)

2. 学会発表

10. Y. Tomita, M. Unekawa, H. Toriumi, K. Masamoto, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Horinouchi, K. Kobayashi, I. Kanno, N. Suzuki / EFFECT OF INJECTION OF ARTIFICIAL RBCS ON HEMORRHAGIC HYPOTENSION IN MICE / XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and the Xth International Conference on Quantification of Brain Function with PET / Barcelona, Spain, May 24 - 28, 2011

11. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi / Characteristics of hemoglobin vesicles as a cellular type artificial oxygen carrier / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29

12. N. Okuda, H. Sakai, S. Takeoka, K. Yamamoto / Influence of hemoglobin-vesicles on cultured human aortic endothelial cells in an in vitro laminar flow perfusion model / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29

13. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, K. Kobayashi / Fluid resuscitation using large volume of hemoglobin vesicle in rat continuous hemorrhage model (2nd report) / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29

14. K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Maruyama, M. Otagiri / Pharmacokinetic properties of hemoglobin encapsulated liposome (hemoglobin-vesicle) in a hemorrhagic shock rat model / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29

15. H. Horinouchi, N. Sasaki, Y. Seishi, K. Kobayashi, H. Sakai. Influence of hemoglobin vesicle on oxygen diffusion constant of arteriolar wall in microcirculation of mouse dorsal skin window chamber / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29

16. Y. Tomita, M. Unekawa, H. Toriumi, K. Masamoto, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Horinouchi, K. Kobayashi, I. Kanno, N. Suzuki. Effect of injection of artificial RBCs on murine hemorrhagic hypotension model / XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Boston, USA / 2011. July 27-29

17. 堀之内宏久、佐々木信彦、山本尚志、小松晃之、山崎真敬、饗庭了、富田裕、泉陽太郎、山本学、勢司泰久、酒井宏水、小林紘一 / 微小循環と酸素運搬体：酸素治療への展望 / 第18回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.

18. 勢司泰久、堀之内宏久、酒井宏水、小林紘一 / ラット制御継続出血ショックモデルを用いた生理食塩分散ヘモグロビン小胞体(Hb-vesicles)の検討 / 第18回日本血液代替物学会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011. 10.27-28.

19. 藤原満博、東寛、大橋乃理子、酒井宏水、堀之

内宏久、小林紘一、池田久實 / ヘモグロビン小
胞体のラット免疫能への影響 — 遺伝子発現プ
ロファイルの解析 / 第18回日本血液代替物学
会 / 北海道大学医学部学友会館フラテ / 2011.

10.27-28.

H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
該当なし

分担研究報告書

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定とGMP製造技術の確立

分担課題：ヘモグロビン小胞体が免疫系に与える影響とその機序の解明

分担研究者	池田久實	北海道赤十字血液センター	名誉所長
研究協力者	東 寛	旭川医科大学小児科学講座	教授
	藤原満博	北海道赤十字血液センター	研究一課長

研究要旨

ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン小胞体(HbV)投与後にラット脾細胞に認められる一過性の免疫抑制を引き起こす機序を解明する目的で、HbVの構成成分でHbを内包しない空リポソームを用い、脾臓リンパ球の増殖に係る転写因子STAT5及び細胞周期に係るタンパク群（cyclin D2, D3, p27kip1）の発現に対する影響を検討した。空リポソームの投与によってex vivoでの脾臓T細胞の増殖が抑制され、この抑制には一酸化窒素（NO）が関与していることを、蛍光色素CFSEを用いたフローサイトメトリー法で再確認した。コンカナバリンA (ConA) 刺激によるSTAT5のリン酸化が、空リポソームの投与によって減少し、NO阻害薬で回復する傾向がみられたがいずれも有意ではなかった。一方、ConA刺激によるcyclin D3, D2の発現は、空リポソームの投与によって有意に減少し、NO阻害薬で回復した。細胞周期を抑制的に調整しているp27kip1の発現においては、生食投与と空リポソーム投与の脾細胞に違いはみられなかった。以上の結果から、空リポソームの投与によるex vivoでの脾臓T細胞のNO依存的な増殖抑制には、細胞周期調整タンパクのcyclinD3およびD2の発現抑制が関与していることが考えられた。

A. 研究目的

我々はこれまでラットの免疫系へのHbVの影響を、摘出脾細胞のex vivoでの培養系において非特異的マイトジェンConAや特異抗原Keyhole limpet hemocyaninに対する反応性で評価をおこなってきた。その結果、HbVおよびHbの内包に用いられる空リポソームの投与で、これらの増殖刺激に対する反応性が一過性に低下すること、そしてこの低下にNOが関与することを既に見出している。NOを介したT細胞の増殖抑制の誘導はさまざまな系において報告され、増殖シグナルの一つである転写因子STAT5のリン酸化の抑制が重要とされる場合や、細胞周期を正に制御するcyclin

D2, D3の発現低下および細胞周期を負に制御するp27 kip1の発現増強が重要とされる場合等が知られている。そこで、今回はこれらのタンパク分子の挙動に着目し、空リポソーム投与の影響について検討を試みた。

B. 研究方法

1. 空リポソーム投与ラットからの脾細胞の調製

実験にはWKAHラット、♂、8-11週齢、体重約200-300 gを用いた。ラットに循環血液量の20% (v/v)に相当するHb分子を内包していない空リポソーム（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。

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にて犠牲死させ、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5-7分間溶血処理をした。溶血処理細胞液に培養液を加え、遠心・洗浄後、培養液に再懸濁して脾細胞とした。

2. CFSE法によるCon A刺激に対するラット脾T細胞の増殖反応の検討

1.で得られた脾細胞をPBS/1%FCSにて2回洗浄後、 1×10^7 /mLに調整し、5 μ M Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE: Molecular Probes)を加え、37 $^{\circ}$ Cにて5分間細胞を染色した。培養液で洗浄後、24穴平底プレートにduplicateで分注 (8×10^5 個/1mL/ウェル) し、Concanavalin A (ConA; Sigma-Aldrich)を加え37 $^{\circ}$ C、5% CO₂にて培養した。培養72時間後に細胞を回収しフローサイトメトリーにて、CFSEで染色された細胞のパターンを解析した。

3. Nitric Oxide (NO)の測定

ConA存在下で3日間培養した上清を回収し、その上清中のNOレベルをGriess Assay Kit (R & D Systems) によって測定した。

4. 細胞抽出液の作製とイムノブロティング

1.で得られた脾細胞を24穴平底プレートに分注 (8×10^5 個/1mL/ウェル) し、ConAを加え37 $^{\circ}$ C、5% CO₂にて培養した。培養72時間後に細胞を回収しPBSにて遠心・洗浄後、 3.2×10^6 個あたり50 μ lのlysis buffer (50mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5%

NP-40, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 10 μ g/ml aprotinin, 25 μ g/ml leupeptin, 1 mM pepabloc, phosStop (1 tablet/10 ml) を加え、4 $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベートした。15000rpm, 10分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心した上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液のタンパク量は、BCA protein Assay Kit (Thermo Pierce)にて測定した。タンパク量 3-5 μ gの細胞抽出液を10%または12.5%ゲル濃度のSDS-PAGEにて分離し、ニトロセルロース膜に転写した。

そのニトロセルロース膜をブロッキング・バッファー (1 \times TBS buffer with 0.1% tween-20 (TBS-T)/2% BSA) 中、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。一次抗体はTBS-T/5%BSAで1:1000に希釈し、室温で3時間、メンブラン上のタンパクと反応させた。洗浄後、TBS-T/5%BSAで1:2000に希釈した horseradish peroxidase (HRP) linked二次抗体と室温で1時間反応させた。洗浄後、検出試薬Lumi GLO (Cell Signaling Technology; CBT)と1分間反応させ、化学発光用のフィルムに感光させた。一次抗体はメンブランよりstripping bufferを用いてはがし、別の一次抗体を用いたタンパク検出を同様に繰り返した。

用いた一次抗体は、phosphoPlus Stat5 (Tyr694) rabbit polyclonal Ab, STAT5 rabbit polyclonal Ab, cyclin D2 rabbit monoclonal Ab, cyclin D3 mouse monoclonal Ab, p27 Kip1 rabbit monoclonal Ab, β -actin rabbit polyclonal Ab, 二次抗体は anti-rabbit IgG HRP-linked Ab, anti-mouse IgG HRP-linked Abで、いずれもCBTより購入した。

5. L-NMMA(iNOS 阻害薬)の脾臓T細胞増殖への影響

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor, NG-monomethyl-L-arginine (2mM; L-NMMA; Alexis Corp., San Diego, CA) を脾細胞の培養系にConAと同時に加え、脾臓T細胞の増殖等への影響を検討した。

C. 実験結果

1. 空リポソーム投与ラット由来の脾細胞のConA応答抑制

CFSEは細胞膜および細胞内タンパクと結合し、細胞の分裂によって生ずる娘細胞に均等に分配される。

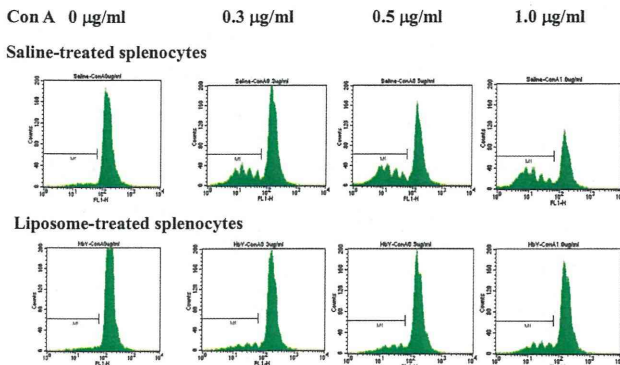


Fig. 1A. Effect of liposome treatment on ConA-induced proliferation of splenocytes.

そのため、Fig. 1Aに示すようにConA未刺激の細胞においては、ピークが一本であるのに対し、ConA刺激による細胞分裂にともなって、蛍光強度の減弱したピークが分裂回数毎にM1領域に出現する。生食投与ラット由来の脾細胞においては、ConA(0.3-1.0 μ g/ml)の濃度に応じて、元のピークが減少し、より蛍光強度の弱いピークがM1領域に増え、分裂回数が多くなっていることが認められた。一方、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞においては、細胞分裂を示すM1領域のピークの増加は僅かであった。Fig. 1Bに定量結果を示す。

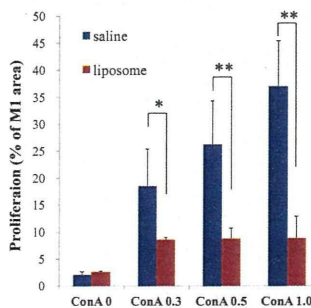


Fig. 1B. Effect of liposome treatment on ConA-induced proliferation of splenocytes. The data are expressed as mean \pm SD (N=3-4). *P<0.05, **P<0.01.

空リポソーム投与ラット由来の脾細胞においては、ConA (0.3-1.0 μ g/ml) の濃度に応じて細胞増殖が亢進するのに対し、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞ではConA応答性が有意に減少した。

2. iNOS阻害薬の投与による、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞のConA応答の回復

空リポソーム投与ラット由来の脾細胞のConA応答抑制へのNOの関与を、iNOS阻害薬L-NMMAを添加することで調べた。Fig. 2A, Bに示すように、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞におけるConA応答の抑制が、L-NMMAをConAと同時に投与することで、生食投与ラット由来の脾細胞のConA応答性と同じレベルまで回復した。

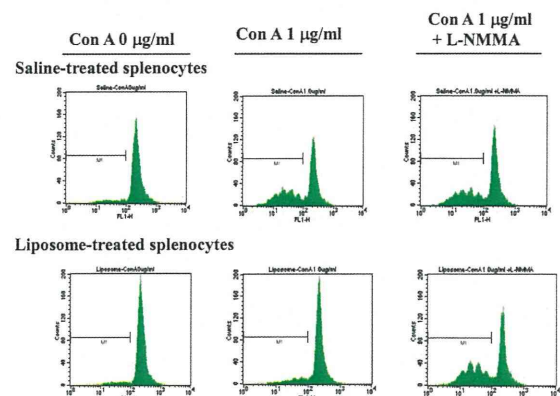


Fig. 2A. Effect of liposome treatment on ConA-induced proliferation.

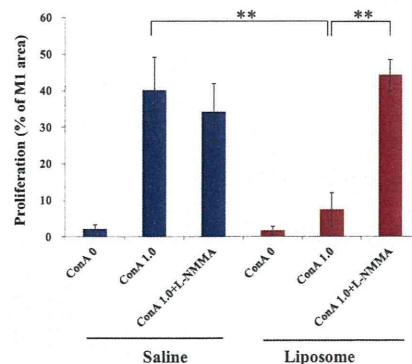


Fig. 2B. Effect of liposome treatment on ConA-induced proliferation. The data are expressed as mean \pm SD (N=5). **P<0.01.

3. 生食投与ラットおよび空リポソーム投与ラット由来の脾細胞におけるNO産生

生食投与ラットではConA濃度に応じて僅かにNO産生が増加するのに対し、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞でのNO産生は有意に高値となった (Fig. 3A) . また、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞でConAとL-NMMAを同時投与すると、NOの産生が著しく抑制された (Fig. 3B).

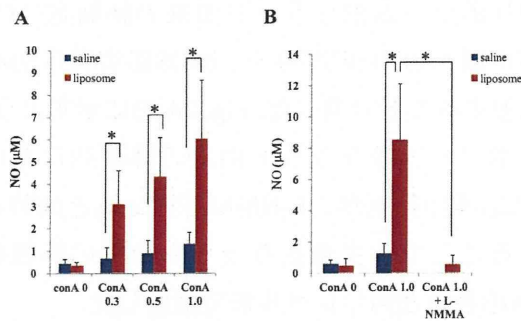


Fig. 3. NO production by saline-treated and liposome-treated splenocytes. (A) The data are expressed as mean \pm SD (N=3-4). *P<0.05, (B) The data are expressed as mean \pm SD (N=3). *P<0.05.

4. ConA刺激によるSTAT5のリン酸化に対する空リポソーム投与の影響

生食投与ラット由来の脾細胞ではConA濃度に応じてSTAT5のリン酸化が亢進したのに対し、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞では、その変化は少なかった。同様に、STAT5自体もConA濃度に応じて発現レベルが増加したのに対し、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞では、発現の増加は僅かであった(Fig. 4A).

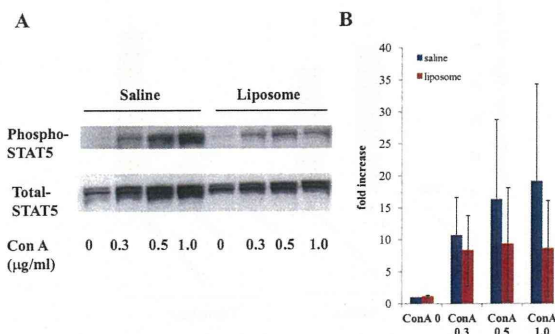


Fig. 4. Effect of liposome treatment on ConA-induced phosphorylation of STAT5. (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean \pm SD (N=3).

生食投与ラット由来の脾細胞でConA未刺激のと

きのSTAT5のリン酸化のバンドの濃さを1として求めた各レーンの比を、同じようにSTAT5自体のバンドの濃さを1として求めた各レーンの比で割り、リン酸化の程度を相対比でノーマライズした(Fig. 4B). 空リポソーム投与ラット由来の脾細胞でのConA刺激によるSTAT5のリン酸化の増加は、生食投与ラット由来の脾細胞の場合よりも減少している傾向が認められたものの、有意ではなかった。STAT5のリン酸化に対するNOの影響をみるためにL-NMMAを添加すると、Fig. 5に示すように空リポソーム投与ラット由来の脾細胞でのConA刺激によるSTAT5のリン酸化の減少が回復する傾向がみられた。

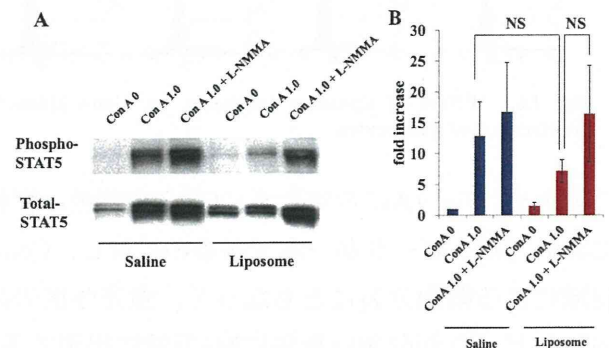


Fig. 5. Effect of liposome treatment on ConA-induced phosphorylation of STAT5. (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean \pm SD (N=3).

5. ConA刺激によるcyclin D3の発現増加に対する空リポソーム投与の影響

生食投与ラット由来脾細胞ではConA濃度に応じてcyclin D3の発現増加が亢進したのに対し、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞ではConAによるcyclin D3の発現増加が有意に抑制された (Fig. 6A, B) . 尚、cyclin D3の発現の変動は、 β -actinのレベルでノーマライズした。この抑制にNOが関与しているかどうかを調べるために、L-NMMAをConAとともに培養系に添加すると、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞でみられたcyclin D3の発現が回復し、生食投与ラット由来脾細胞の場合と同レベルになった (Fig.7A, B).

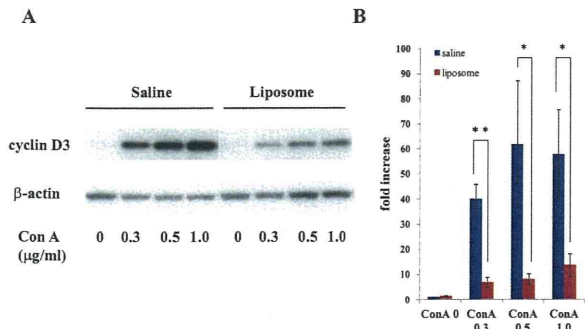


Fig. 6. Effect of liposome treatment on ConA-induced expression of cyclin D3 . (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean \pm SD (N=3). *P<0.05, **P<0.01

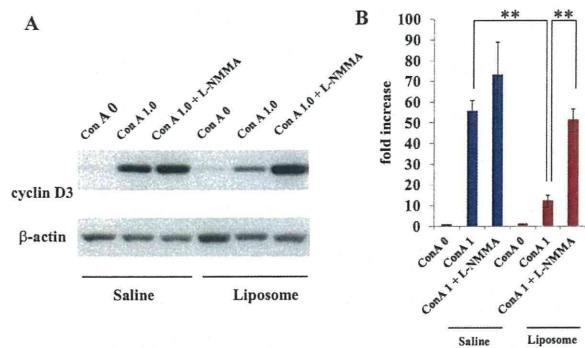


Fig. 7. Effect of liposome treatment on ConA-induced expression of cyclin D3 . (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean \pm SD (N=3). **P<0.01.

6. ConA刺激によるcyclin D2の発現増加に対する空リポソーム投与の影響

cyclin Dファミリーの、別のタンパク質cyclin D2についても検討した。Cyclin D2も空リポソーム投与ラット由来の脾細胞ではConAによるcyclin D2の発現増加が有意に抑制されるのに対し、L-NMMAをConAとともに同時添加するとcyclin D2の発現が回復する傾向が認められた (Fig. 8A, B) .

7. ConA刺激によるp27 kip1の発現減少に対する空リポソーム投与の影響

細胞周期タンパクの中でp27 kip1は、細胞分裂を負に制御している。p27 kip1の発現増加は細胞分裂の抑制の方向に働くと考えられる。生食投与ラット由来脾細胞では未刺激の場合に比べ、ConA刺激によってp27 kip1の発現減少が認められた。同様に

空リポソーム投与ラット由来の脾細胞においてもConA刺激によってp27 kip1の発現が減少した (Fig. 9) .

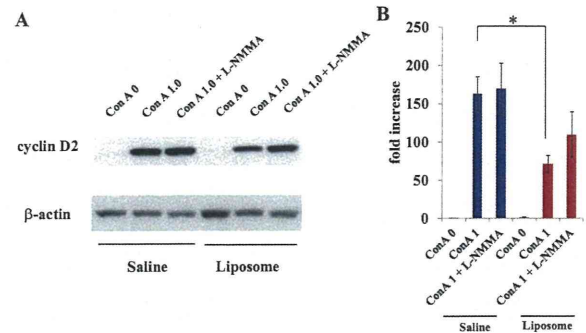


Fig. 8. Effect of liposome treatment on ConA-induced expression of cyclin D2. . (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean \pm SD (N=3). *P<0.05.

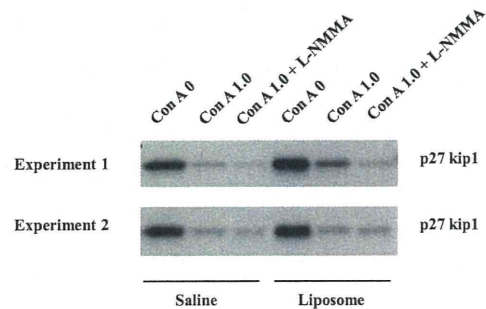


Fig. 9. Effect of liposome treatment on ConA-induced expression of p27kip1.

D. 考察

ラットの免疫系への空リポソーム投与の影響を、摘出脾細胞のex vivoでの培養系において非特異的マイトジェンConAや特異抗原Keyhole limpet hemocyaninに対する反応性で評価をおこなってきた。その結果、HbVを構成するHbを包埋していない空リポソームの投与のみで、一過性にこれらの刺激に対する反応性が低下すること、そしてこの低下にNOが関与することを既に見出している。NOを介したT細胞の増殖抑制の誘導がさまざまな系において報告されている。増殖シグナルの一つである転写因子STAT5のリン酸化の抑制が重要とされる場合や、細胞周期を正に制御するcyclin D2、