

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。

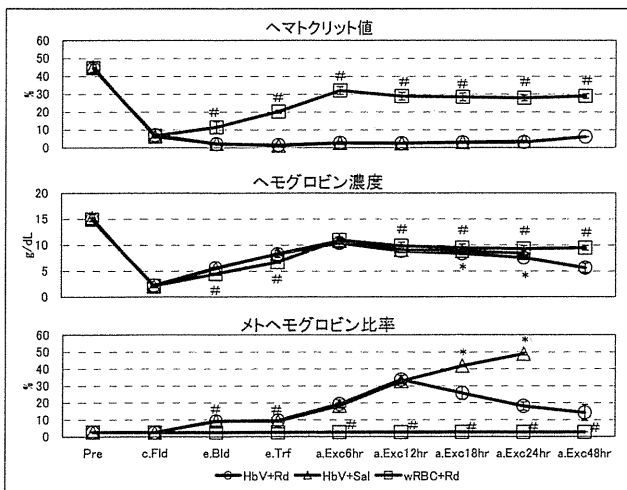


Fig. 5 Hematocrit, Hemoglobin and Methemoglobin, *: HbV+Rd vs. HbV+Sal, #: HbV+Rd vs. wRBC+Rd (P = 0.05)

(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。

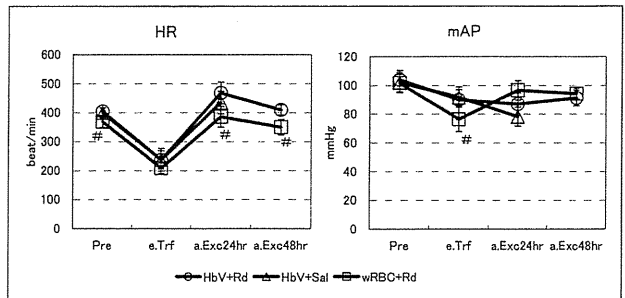


Fig. 6 Heart rate and Mean arterial pressure, #: HbV+Rd vs. wRBC+Rd (P = 0.05)

(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ど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。

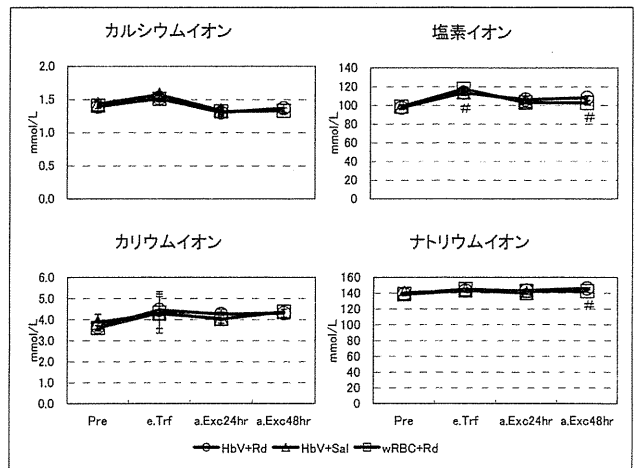


Fig. 7 Electrolyte, #: HbV+Rd vs. wRBC+Rd (P = 0.05)

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

9. 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

A. 研究目的

我々は、Hb小胞体(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の投与により脾臓に一過性にT細胞の増殖を抑制すること、HbVを貪食した細胞が抑制に関与している可能性を検討してきた。本研究は、HbVを貪食した細胞を選択的にソートすることにより、それらの細胞がT細胞の増殖抑制に関与していることをより詳細に確認することを目的としている。

B. 研究方法

1. Concanavalin 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、♂、8-12週齢、体重約200-330 gを用いた。ラットに循環血液量の20% (v/v)に相当するHbV溶液あるいは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、Concanavalin A (Con A; Sigma-Aldrich) (終濃度0.3, 3 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)。

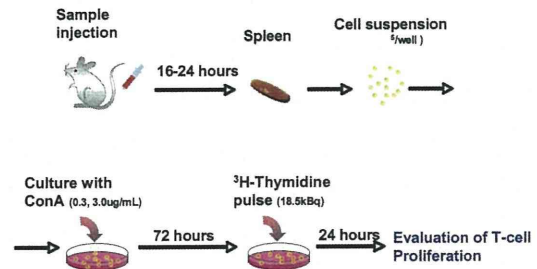


Fig. 1. Experimental protocol for evaluation of the effect of liposome on Con A stimulated T cell proliferation

2. FITCを標識した空vesicle (FITC-vesicle)のソーティングとその抑制活性の検討

Hb小胞体と同じ組成であるがFITC-lipid (N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt) (Molecular Probes)を含有した蛍光標識空小胞体 (FITC-vesicles)を調製し、ラットに循環血液量の20%相当量を投与し、FITC陽性を示す細胞分画をフローサイトメーター (Aria; BD Bioscience)を用いてソートした。同時にFITC陰性の細胞分画もソートした。

ソートした細胞をコントロール脾細胞 (生理食塩水を投与したラットの脾細胞)に種々の割合(1:1から1:1/32)で加え、コントロール脾細胞の増殖に与える影響を検討した。

3. 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

単離した脾細胞をPBS/1%FCSにて2回洗浄後、1 \times 10⁷/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 \times 10⁵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。

4. 細胞抽出液の作製とイムノブローティング

単離した脾細胞を24穴平底プレートに分注(8×105個/1mL/ウェル)し, ConA(終濃度 0.3, 0.5, 1.0 μg/ml)を加え37℃, 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, 3.2×10⁶個あたり50 μlのlysis buffer (50mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 10 μg/ml aprotinin, 25 μg/ml leupeptin, 1 mM pepabloc, phosStop (1 tablet/10 ml))を加え, 4℃にて30分間インキュベートした。15000rpm, 10分間, 4℃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 μg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×TBS buffer with 0.1% tween-20 (TBS-T)/2% BSA)中, 4℃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 Signalling 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。

5. 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。

6. L-NMMA(iNOS inhibitor) と nor-NOHA(arginase inhibitor) のT細胞抑制への影響

Inducible nitric oxide synthase(iNOS) inhibitor, NG-monomethyl-L-arginine (2mM; L-NMMA; Alexis Corp., San Diego, CA) と arginase inhibitor, Nw-Hydroxy-nor-L-arginine, Diacetate Salt (0.5mM; nor-NOHA; Calbiochem, San Diego, CA)を, それぞれ, あるいは両者をHbVを投与した脾細胞の培養系に加えて, T細胞の増殖やタンパク分子の発現への影響を調べた。

7. 抗体と試薬

FITC-EVを貪食した細胞の表面マーカーの検出はLSR flow cytometer(BD Bioscience)を用いた。抗体は以下に示したものを使用した。PE-conjugated anti-CD8a(OX8), CD25(OX39), CD11a(WT-1), CD172(OX41), CD172(OX41), CD172(OX41), CD172(OX41), HIS48(anti-grnuloocyte), CD103(OX62), CD161(NKR-P1A), HLA class I(OX18), HLA class II(OX6), CD80, CD86. APC-conjugated CD11b/c. 以上はBD Bioscienceより購入した。また, APC-conjugated anti-rat CD3 はImmunotechより購入した。各々, 少なくとも10,000個の細胞を測定し, 結果をCELLQUEST software(BD)にて解析した。

タンパクのウェスタン・ブローティングにおいて用いた一次抗体は, 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。

C. 研究結果

1. HbV貪食細胞のT細胞増殖抑制効果

FITC陽性細胞 (vesicleを貪食した細胞) は全脾細胞の5%程度であった.その部分をgateした細胞 (純度は95%以上) を標記の割合でコントロール脾細胞に加え, T細胞の増殖を評価した(Fig. 2, 3).

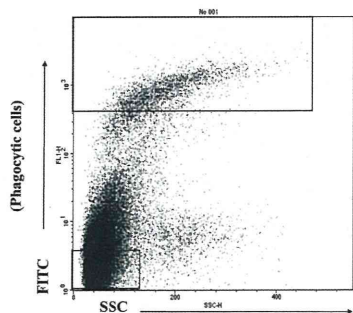


Fig. 2. Sorting of FITC-positive cells by flow cytometry
FITC labeled empty liposome(FITC-EV) was injected into rats and spleens were excised the next day. Subsequently, single spleen cells were analyzed using FCM. Cells that phagocytized FITC-EV(upper square) were recognized clearly as FITC-positive cells. The cells (upper square) were sorted by FCM. The purity of them was >95%.

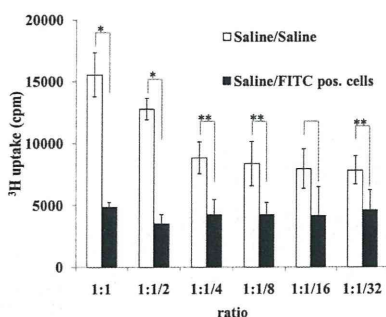


Fig. 3. Suppressive effect of FITC-positive cell on the proliferation of control splenocytes
Saline-loaded bulk splenocytes (2×10^5 /well) were simulated with Con A ($0.3 \mu\text{g/ml}$) in the presence of the sorted cells at indicated ratios. Saline-loaded bulk splenocytes was used as control cells. The splenic T cell proliferation was inhibited by FITC-positive cells (liposome phagocytized cell) in a dose-dependent manner. Data are representative of two independent experiments and are expressed as mean \pm SD ($n=3$). *: $p<0.01$ compared to control. **: $p<0.05$ compared to control.

Table 1. Proliferation of FITC-negative cells and bulk splenocytes

Con A($\mu\text{g/ml}$)	0	0.3	1.0
Saline	1410 \pm 319	6332 \pm 32	18092 \pm 654
FITC-EV(bulk)	1872 \pm 2045	3575 \pm 1200	7586 \pm 200
FITC-negative	1818 \pm 515	8061 \pm 3292	81848 \pm 5277

T cell proliferation of FITC-negative cells (2×10^5 /well) and FITC-EV loaded bulk splenocytes was compared with that of saline-loaded splenocytes. No inhibition was observed in FITC-negative cells. Data are representative of two independent experiments and ^3H -thymidine uptakes are expressed as mean \pm SD ($n=3$). *: $p<0.01$ compared to control. **: $p<0.05$ compared to control.

FITC陽性細胞は, その量に依存してコントロール脾細胞の増殖を抑制することが確認された.一方, FITC陰性の細胞をソートして, その増殖を検討した結果, 抑制が解除されていることおよび, Con A

濃度が $1 \mu\text{g/ml}$ では, コントロールより良く増殖することが示された(Table 1). これらの結果から, FITC陽性細胞, すなわちHbVを貪食した細胞が, T細胞の増殖を抑制している細胞であることが確認できた.

2. HbV貪食細胞のフェノタイプの検討

FITC陽性細胞(HbV貪食細胞)の表面マーカーに関して, HIS48抗体(ラット顆粒球に反応する抗体)を新たに購入し検討した. FITC陽性細胞でHIS48陽性のものはその16%のみで, 脾細胞全体のわずか0.7%であった(Fig. 4 upper). 一方, CD11b/c+, HIS48-細胞の80%以上がFITC陽性であるのに対して, CD11b/c+, HIS48+細胞でFITC陽性のものは30%弱しかなかった(Fig. 4. middle and lower).

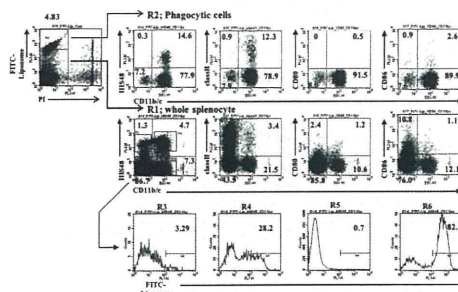
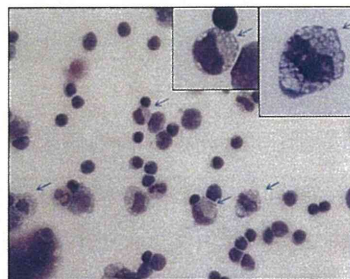


Fig 4. Flow cytometric analysis of whole splenocyte and FITC-positive cells
Splenocytes derived from FITC labelled-empty vesicles (FITC-EV) loaded rat spleen were analysed. Upper: FITC-positive cells were gated in R2, Middle: whole splenocytes were gated in R1. Subsequently, the gated cells were analyzed for the indicated cell surface markers. Lower: whole splenocytes that were divided into 4 subsets in terms of HIS48 and CD11b/c positivity (Middle left) was further analyzed for FITC intensity. Most of FITC-positive cells were positive for CD11b/c but negative for class II, CD80, CD86 and HIS48. In addition, most of CD11b/c+ cells were positive for FITC intensity.



May-Grunwald Giemsa ($\times 600, \times 1000$)

Fig. 5. Microscopic examination of cells appeared after injection of HbV
HbV-loaded splenocytes were spun on slide glass and stained with May-Grunwald-Giemsa dye. Images were visualized using BX50 light microscope equipped with 40x/0.75 or 100x/1.3 oil objective lens to give original magnification at the time of photomicroscopy as $\times 400$ and $\times 1000$, respectively. Arrows indicate unique cells that appeared after injection of empty vesicles. They appeared to belong to monocytes.

また, CD11b/c陽性細胞はおおむねclass II-, CD80-, CD86-であた. さらに, これらの細胞の多くがHbVを貪食していることが確認された. 加え

て、HbV投与後の脾細胞をGiemsa染色では、細胞質にリポソームを内包しているように見える特異な細胞が観察され、これらが FITC陽性であることを確認できた。形態的には monocyte/macrophage系の細胞である(Fig. 5)。

3. iNOS inhibitor と arginase inhibitorによるT細胞増殖抑制の解除

HbV投与後に認められるT細胞増殖抑制は、iNOS inhibitorあるいはarginase inhibitorの存在下である程度の解除が認められた。両者が同時に存在するとより解除が明らかとなった(Fig. 6)。このことは、T細胞の増殖抑制には iNOS と arginase活性の上昇が関与していることを示している。

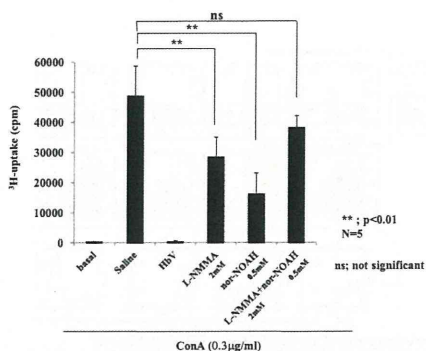


Fig. 6. Effect of L-NMMA and nor-NOHA on the suppression of T cell proliferation. Each rat was injected with HbV or saline and splenocytes were stimulated with Con A(0.3μg/ml) in the presence or absence of iNOS inhibitor (L-NMMA, 2mM) or arginase inhibitor (nor-NOHA, 0.5mM) or both. T cell proliferation was evaluated as described in materials and methods. Data were expressed as mean ± SD (N=5). T cell proliferation was restored in the presence of each inhibitor to a certain degree. Significant inhibition was disappeared in the presence of the both inhibitors, suggesting both iNOS and arginase were involved in the suppression.

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

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, 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の挙動に着目し、HbVを含まない空リポソーム投与の影響の検討を試みた。タンパク発現をみるためには、これ

まで用いてきた系よりも多くの細胞数を必要とするため、最初に系の確立を試みた。タンパク抽出をおこなう系と並行して、CFSEを用いた脾細胞の増殖ならびにNOレベルの測定をおこなったが、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞ではConA応答性が有意に低下すること、またConAの応答性の低下にNOが関与するというこれまでの我々の結果を再確認した(データは示さず)。

その系において、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. 7A)。

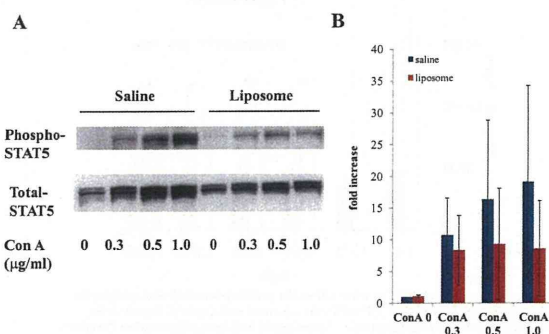


Fig. 7. Effect of liposome treatment on ConA-induced phosphorylation of STAT5. (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean ± SD (N=3).

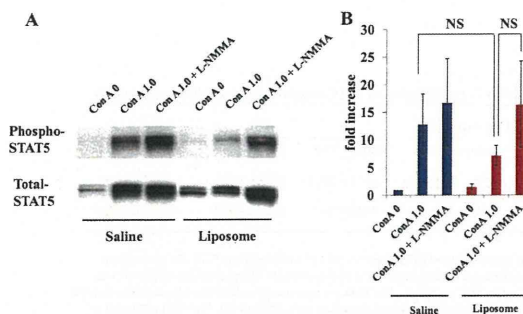


Fig. 8. Effect of liposome treatment on ConA-induced phosphorylation of STAT5. (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean ± SD (N=3).

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ゼーションした(Fig. 7B). 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. 8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。

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. 9A, B) . 尚, cyclin D3の発現の変動は、 β -actinのレベルでノーマライゼーションした。

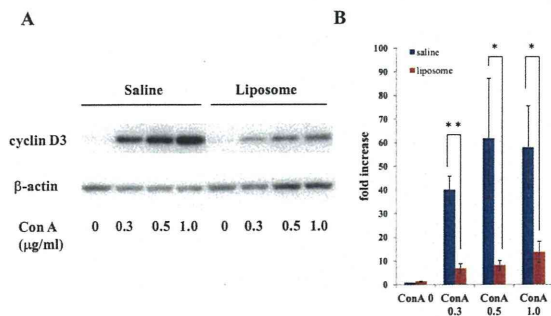


Fig.9. Effect of liposome treatment on ConA-induced expression of cyclin D3 . (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean \pm SD (N=3). *P<0.05, **P<0.01

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の発現が有意に回復し、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.10A, B).

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. 11A, B).

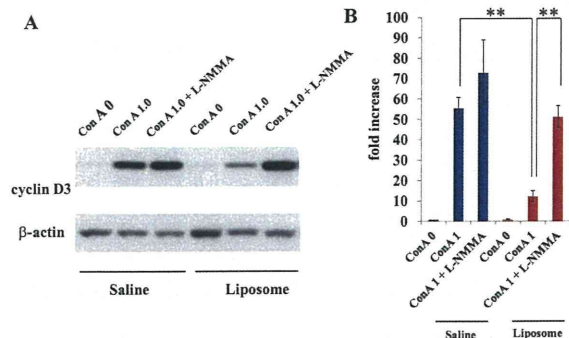


Fig.10. Effect of liposome treatment on ConA-induced expression of cyclin D3 . (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean \pm SD (N=3). **P<0.01.

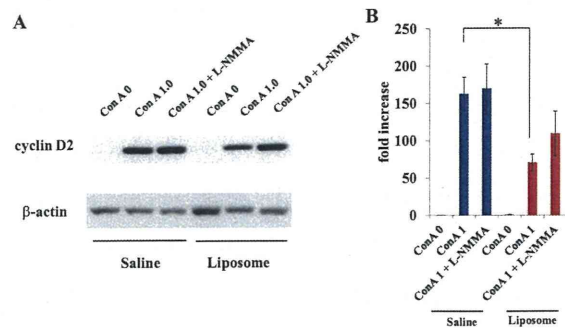


Fig.11. Effect of liposome treatment on ConA-induced expression of cyclin D2 . (A) The data are representative of 3 independent experiments. (B) The data are expressed as mean \pm SD (N=3). *P<0.05.

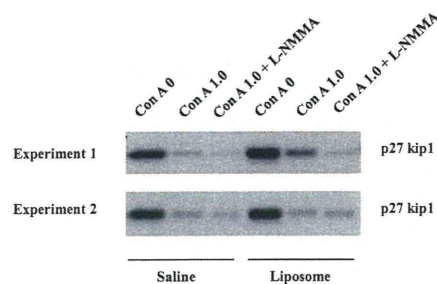


Fig. 12. Effect of liposome treatment on ConA-induced expression of p27kip1.

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

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。同様に空リボ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. 12)。

D. 考察

HbVの投与後にラット脾細胞に認められる一過性のT細胞増殖抑制効果は、脾の mononuclear phagocytic system (MPS)として存在しているCD11b/c+, class II-, CD80-, CD86-のphenotypeをもつ細胞が HbVを貪食することにより、強力な免疫抑制細胞として作用するようになることに起因すると考えられる。

近年、強力な免疫抑制作用を有する骨髄系の細胞が注目を集めている。それらは myeloid suppressor cell あるいは immature myeloid cell と呼ばれていたが、現在 myeloid derived suppressor cell (MDSC) と呼ぶことが提唱されている。MDSCは腫瘍、感染症、炎症、ストレスなど種々の病態下で現れ、かつ形態や性質も多様であるとされている。しかしながら、もっとも重要な点は強い免疫抑制作用を有しているということである。

最近、マウスの MDSC は CD11b+, Gr-1 (granulocyte marker) weakly +, class II- のフェノタイプを持つものとされた。ラットの MDSC の代表的なフェノタイプはまだ定まっていないが、マウス Gr-1 の counter part として HIS48 が報告されている。すなわち、ラット MDSC の一部は CD11b+, HIS48+ である可能性が指摘されている。我々の検討では HbV 貪食細胞の中に CD11b/c+, HIS48+ 細胞が含まれていることが確認

されたが、その細胞は全脾細胞の中の1%にも満たないことから、抑制効果をもたらす細胞が、この細胞群に限定されているとは考え難い。むしろ、HIS48の発現の有無には関係なく、CD11b/c+, class II- のフェノタイプを有する細胞が免疫抑制効果を発揮していると考えerほうが妥当である。これらの細胞は、CD11b/cを発現しているが、ほとんどの細胞はclass IIやCD80, CD86は発現していない。このことと、形態学的な観察結果から、問題の細胞は未熟な単球であると言える。このことは、MDSCが当初は immature myeloid cell と言われたことと矛盾しない。一方これらの細胞のclass II, CD80, CD86分子はHbVの貪食に伴い発現量が低下した可能性もある。しかしながら、コントロールの脾細胞のCD11b/c陽性細胞もその多くがclass II-, CD80-, CD86-であった(データは示していない)ことから、その可能性は否定的である。

免疫抑制効果の機序については、既に、cell-to-cell contactが必要であること、iNOSが関与していることなどを明らかにしてきた。今回はこれらに加えてarginaseの関与も示唆することができた。両者のinhibitorの存在下では、より顕著に抑制を解除できたことから、二つの酵素の活性化が抑制効果の発現に重要であることが確認できた。また、増殖抑制を受けたT細胞は、活性化しIL2を産生するが増殖には至らないことを既に示しているが、それらが最終的にapoptosisに至るというデータも得ている(データは示していない)。これらの機序は今までに報告されているMDSCの抑制機序と矛盾しない。以上のことより、HbVを貪食したCD11b/c+, class II- immature monocytesは機能的には、いわゆるMDSCと同等であると言える。

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, 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の挙動に着目し、空リポソーム投与の影響の検討を試みた。タンパク発現をみるためには、これまで用いてきた系よりも多くの細胞数を必要とするため、最初に系の確立を試みた。タンパク抽出をおこなう系と並行して、CFSEを用いた脾細胞の増殖ならびにNOレベルの測定をおこなったが、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞ではConA応答性が有意に低下すること、またConAの応答性の低下にNOが関与するというこれまでの我々の結果を再確認した。

この系において、STAT5のリン酸化を調べたが、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞においてConA刺激に対するリン酸化の低下が認められたが、STAT5自体の発現も減少しているため、STAT5の量でノーマライゼーションすると、有意差はみられなかった。このことから、NOを介したT細胞増殖抑制機序の一つとしてSTAT5のリン酸化抑制をあげる系が報告されているが、空リポソーム投与による脾細胞の増殖抑制においては、別の機序の果たす役割が大きいと推察された。

細胞周期の各段階は、異なるCyclin-CDK (cyclin-dependent kinase)複合体と、CDK阻害因子によって複雑に制御されている。G1期の通過とS期への移行はCyclin D-CDK4とCyclin E-CDK2複合体が鍵となっている。増殖刺激によってcyclin Dが合成され、CDK4と結合する。活性化された複合体はRbタンパク質をリン酸化する。Rbがリン酸化されると結合している転写因子E2Fが離れ、cyclin EなどのS期進行やDNA複製に必要な遺伝子群の発現が誘導される。P27kip1はCDK阻害因子の一つで、cyclin E-CDK2複合体に結合し、CDK活性を阻害する。このようなカスケードの中において、cyclin D2, D3およびp27kip1の発現について検討を試みた。増殖刺激ConA処理によって、生食投与ラット由来の脾細胞においては、cyclin D3およびcyclin D2の発現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においては有意な発現低下が認められ、その低下はiNOS阻害薬の投与によって回復した。NOを介したT細胞の増殖抑制にcyclin D familyの発現抑制が報告されているが、空リポソーム投与において見られる脾臓T細胞の増殖抑制においても、NOを介したcyclin D familyの発現抑制が関与している可能性が示唆された。また、他の実験系においてはp27 kip1の発現が亢進することがT細胞の増殖抑制の一因であるとの報告があるが、今回の検討ではp27 kip1は未刺激状態よりもむしろ減少し、その程度は生食投与ラットと空リポソームラットの脾細胞において違いは見られなかった。よって空リポソームラットの脾細胞での増殖抑制においてp27 kip1の関与は少ないと考えられた。HbVや空リポソームを貪食したimmature monocyteが、増殖刺激存在下、脾臓T細胞とcell-to-cell interactionを介してNOを産生し、どのように細胞周期関連タンパクの発現を低下させるかについては、タンパクのニトロソ化やニトロ化の可能性を含め今後の検討が必要である。

E. 結論

ラットにHbVを投与すると脾細胞の免疫応答が一過性に抑制される。その原因として、脾のMPSを構成しているCD11b/c+, class II- immature monocytesがHbVを貪食し、その結果一過性に強力な免疫抑制能を獲得することが考えられる。免疫抑制の機序は、iNOSとarginase活性の上昇を介した、NOの産生とarginineの欠乏によるものであり、NO産生の増加によって細胞周期調整タンパクであるcyclin familyの発現減少が免疫抑制に関与していると考えられた。

10. ヘモグロビン小胞体のin vivoでの免疫応答に与える影響

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 の投与により脾臓に一過性に T 細胞の増殖が抑制されること、HbV を貪食した CD11b/c+, class II- の immature monocyte が抑制に関与している可能性を明らかにしている。本研究は、このような ex vivo の結果が、in vivo の免疫応答にも反映される可能性があるか否かを明らかにすることを主たる目的としている。

B. 研究方法

1. KLHによる免疫

WKAH ラットを KLH (keyhole limpet hemocyanin) 溶液 (200 μ g KLH in 0.5ml saline) あるいは saline を同量の incomplete Freund's adjuvant と混和してよく混ぜたのち、その 0.5ml を皮下に注射した。その 14 日後に、HbV あるいは saline を i.v. し翌日に再び incomplete Freund's Adjuvant と混和した KLH 0.5ml を皮下注射したのち、day 16, 18, 20, 22 に尾静脈から採血し、KLH 抗体価の測定まで血清を凍結保存した (Fig. 1)。

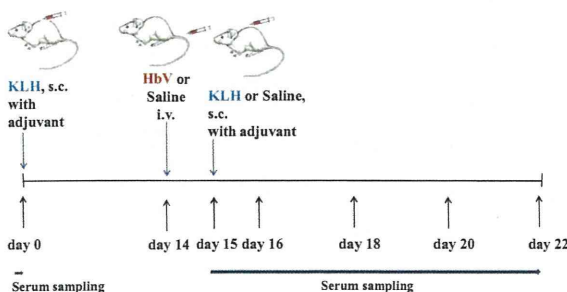


Fig. 1 Experimental design

Sera were frozen at -20C until they were assayed for anti-KLH-IgG and anti-KLH-IgM. Spleen were taken out 2-3 months after the 2nd injection of KLH and evaluated the proliferation of splenocytes in response to KLH or Con A. KLH: keyhole limpet hemocyanine

2. 血清中のKLH抗体価の測定

ラット血清中のKLH IgG抗体およびIgM抗体の測

定は、レビス KLH ラット-IgG ELISA キット (シバヤギ株式会社,群馬) および レビス KLH ラット-IgM ELISA キット (シバヤギ) を用いた。KLH IgGの測定においては、血清を50000倍に、KLH IgMの測定においては、20000倍に希釈した。

3. 脾臓内のKLH特異的T細胞の検出

KLHで免疫後2-3か月後のラットを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、ConA (終濃度0.3, 3 μ g/ml) およびKLH(最終濃度1, 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-Thymidine量を液体シンチレーションカウンタで測定した。

4. 末梢血中の同種細胞の検出

実験はWKAHラット (RT-1k) およびF344ラット (RT-1lv1), 9-12週齢, 体重約280-330 gを用いて、以下の二つのプロトコールにて行った。

プロトコール 1 (Fig. 2)

WKAH ラットにsalineを投与後、翌日にCFSEで染色しsalineに浮遊したWKAHラットの脾細胞 (3および6 \times 10⁷/3ml)を尾静脈よりi.v.した。その後、

経時的に尾静脈より採血し、塩化アンモニウム-トリス緩衝液 (IBL免疫生物研究所) にて溶血後、末梢血単核球中の Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Invitrogen)陽性細胞 (FITC陽性細胞)の割合をFlow cytometer(FCM)にて測定した。

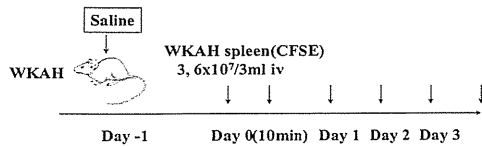


Fig. 2. Protocol 1

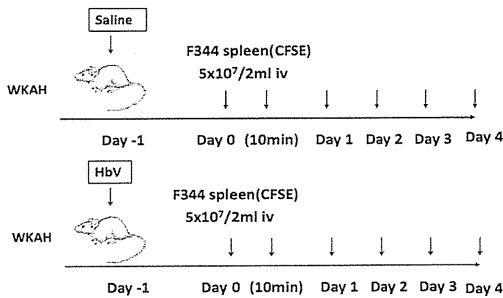


Fig. 3. Protocol 2

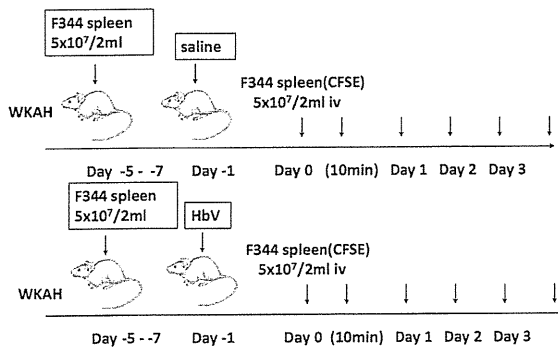


Fig. 4. Protocol 3

プロトコール2 (Fig. 3)

WKAH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。翌日、F344ラットから脾臓を取り出し、脾細胞のsingle cell suspension とし、CFSEにて染色した後に、 $5 \times 10^7/2\text{ml}$ in 1%FCS/PBSの細胞浮遊液を作成し、その全量を尾静脈より輸注した。輸注後、10min, 1day, 2day, 3day, 4day後に尾静脈より採血し塩化アンモニウム-トリス緩衝液 (IBL免疫生物研究所) にて溶血したのち、FCMにて、末梢血単核球中に存在するFITC陽性細胞の割合を測定した。

プロトコール3 (Fig. 4)

1週間前にあらかじめF344由来の脾細胞 $5 \times 10^7/2\text{ml}$ in 1%FCS/PBSで免疫しておいたWKAHラットに、上記のプロトコール2と同様にCFSEで染色したF344ラットの脾細胞を輸注した後に、経時的に末梢血単核球中に存在するFITC陽性細胞の割合を測定した。

5. 脾細胞浮遊液の調整とCFSE染色

エーテル麻酔下で犠牲死し、脾臓を摘出したのち、培養液 (RPMI 1640/10%FCS/50 μl 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PBS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) 10 mLにて10分間溶血処理をした後、メEDIUM (10%FCS/RPMI1640) 5mlを加えたのちナイロンメッシュでデブリスを除去して、再度遠心操作を加えて上清を除去し、細胞数をカウントし、 1×10^8 個の脾細胞をPBS/1%FCSに浮遊して2回洗浄し、5mlのPBS/1%FCSに浮遊した。そこにDMSOに懸濁したCFSE、を20 μl (最終濃度5 μM)となるように添加し37 $^{\circ}\text{C}$ 5minインキュベーションした。その後1%FCS/PBSで2回洗浄し、 5×10^7 個/2ml PBS/1%FCSのものを5ml シリンジに移した後、尾静脈よりi.v.した。染色した脾細胞は実験開始前にFCMでCFSEに染色されていることを確認した (Fig. 5)。

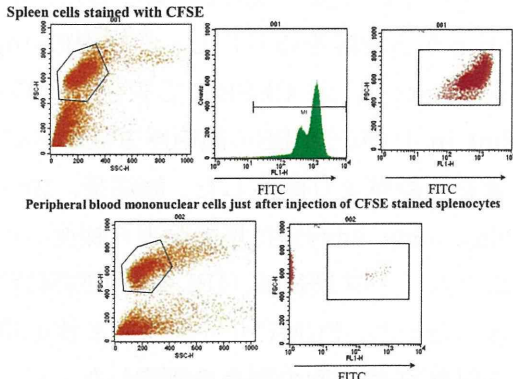


Fig. 5. Analysis of injected cell (FITC positive cells) in peripheral blood. Mononuclear cell fraction of peripheral blood were gated first and analyzed. Small but substantial percentage of cells were found to be positive for FITC.

C. 実験結果

1. HbV投与の抗KLH抗体産生反応におよぼす影響

KLH特異的T細胞を誘導しておくために、まずKLHにてラットを免疫した。その後、2回目のKLH刺激を与える直前にHbVを投与しておく、KLH特異的T細胞の反応が抑制される可能性があることが ex vivoの実験結果から予想された。In vivoでT細胞の反応が抑制されるとすれば、KLH特異的抗体産生が抑制されることが推測された。ところが、HbVの投与の有無にかかわらず、2回目のKLH刺激後に抗KLHIgG抗体価は同様に上昇した。(Fig. 6).

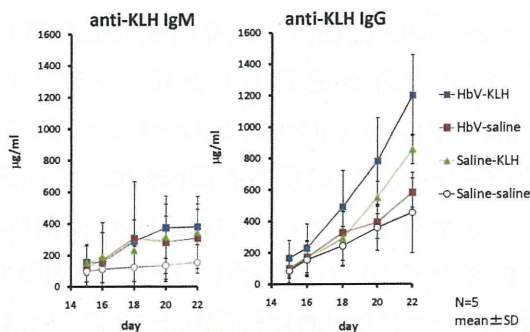


Fig. 6. Effect of HbV on the 2nd immune response. IgG secondary response against KLH antigen were observed regardless of injection of HbV one day before the second challenge of KLH.

2. KLH特異的メモリーT細胞の検出

HbV投与後に再度KLH刺激を受けたラットを2~3カ月後に犠牲死し、KLH特異的メモリーT細胞

が残存しているか否かを検討した。その結果、HbV投与下でKLHによる2次刺激を受けたラットの脾臓中にも、コントロールのラットと同様のT細胞の増殖反応が認められた。すなわち、KLH特異的メモリーT細胞は、HbV投与の影響をうけることなく体内にとどまることが示された (Fig. 7)。

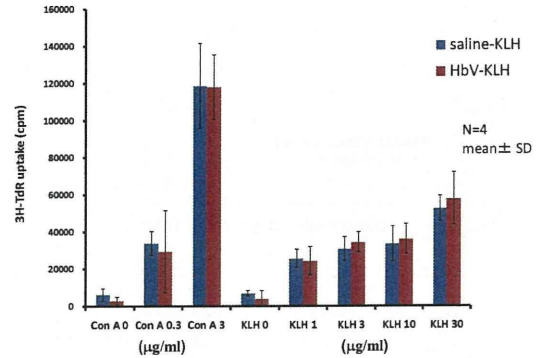


Fig. 7. Ex vivo splenocytes proliferative response to KLH. KLH specific T cell were shown present in spleen taken from the rat which received the secondary challenge of KLH under the HbV load 3 months earlier.

3. HbV投与の自己およびアロ脾細胞の血中消失時間に与える影響

WKAHラットの脾細胞をCFSEで染色し、WKAHラットに投与し、CFSE染色細胞の血中からの消失時間を検討した。実測値にもっとも近い関数は指数関数であった。得られた指数関数から求められた半減期は、 3×10^7 個、 6×10^7 個投与した場合でそれぞれ、4.7日、6.3日であった(Fig. 8. left, Table 1). WKAHラットにあらかじめHbVを投与し、翌日にF344ラット由来のCFSE染色した脾細胞を投与した場合の半減期は、およそ1日であり、この値は salineを投与したコントロールラットの場合と同様であった。(Fig. 8. Middle, Table 1). また、あらかじめF344ラット由来の脾細胞でWKAHラットを免疫しておき、その後にCFSEで染色したF344ラット脾細胞を輸注した。コントロールラットおよびあらかじめF344ラットの脾細胞で免疫したラットとも、輸注10分後には、CFSEで染色した細胞の割合は1%以下となっており、1日後には完全に末梢血から消失していた(Fig. 8. right).

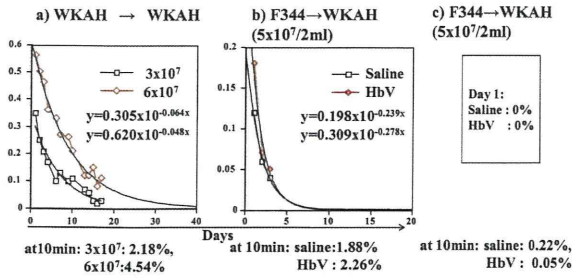


Fig. 8. Half life of the injected cells in peripheral blood
 a) Autologous splenic cells (3×10^7 or 6×10^7) were intravenously injected into rat. The half life of each cells in peripheral blood was 4.7 and 6.7 day, respectively. b) rats were injected with saline or HbV and then allogeneic cells (5×10^7) were intravenously injected into them on the next day. Half life of injected cells was 1.26 and 1.08, respectively. c) Rats were preimmunized with allogeneic cells (5×10^7) a week earlier. Then, they were injected with saline or HbV and then allogeneic cells (5×10^7) were intravenously injected. The infused allogeneic cells were promptly disappeared.

D. 考察

今まで、HbVを大量に投与すると、脾の未熟なマクロファージがそれらを貪食し、一過性に強力な免疫抑制作用を有することを報告してきた。しかしながら、脾臓に認められるこれらの抑制性細胞が、全身の免疫応答に影響を与えるか否かは不明であった。また、ex vivoの培養系では、HbV投与後に取り出した脾細胞をConAで刺激すると、その一部は最終的にapoptosisを起こすことを示唆する

実験結果もあった。そこで、ex vivoの系をin vivoで反映させることを目的として、KLHで一次免疫を行ったラットに対して、HbV投与下で再度KLHによる刺激を与え、KLHに対する抗体価の変化を、コントロールと比較することとした。KLHはT細胞依存性の蛋白抗原であるので、それに対する抗体産生反応は、生体内のKLH特異的なT細胞の機能を評価することと等しい。その結果、HbV投与下の二次免疫反応(KLH特異抗体の産生)は、saline投与下(コントロール)と同等あるいはそれ以上の良好な反応を示した(Fig 6)。さらに、KLH投与後2-3か月後に、KLH特異的T細胞の反応を検討した結果もコントロールと同等の反応が観察できた(Fig 7)。今までのex vivoにおける検討では、刺激を受けても増殖しないT細胞が最終的にapoptosisを起こす可能性があった。すなわち、in vivoでKLH抗原刺激を受けたKLH特異的T細胞が、apoptosisを起こして消滅する可能性があった。しかしながら、この結果は、in vivoに於いてはKLH

Table 1

No of Exp	preimmunization	Injection	No of cell infused	cell origin	10min	half time
Exp. 1	none	saline	3×10^7	auto	2.18	4.7
		saline	6×10^7	auto	4.54	6.3
Exp. 2	none	saline	5×10^7	allo	1.88	1.26
		HbV	5×10^7	allo	2.26	1.08
Exp. 3	none	saline	5×10^7	allo	4.56	0.83
		HbV	5×10^7	allo	4.07	0.98
Exp. 4	none	saline	5×10^7	allo	2.14	1.15
		HbV	5×10^7	allo	4.1	0.66
Exp. 5	F344 (5×10^7)	saline	5×10^7	allo	0.22	n.e.
		HbV	5×10^7	allo	0.05	n.e.
Exp. 6	F344 (5×10^7)	saline	5×10^7	allo	0.04	n.e.
		HbV	5×10^7	allo	0.02	n.e.

Exp. 1 and 2: CFSE stained splenocytes derived from WKAH rat were infused intravenously into WKAH rat. Exp. 2, 3 and 4: WKAH rats were loaded with HbV (or saline), then CFSE stained splenocytes derived from F344 were infused intravenously into them 24 hours later. Exp. 5 and 6: WKAH rats were intravenously preimmunized with F344 splenocytes. Seven days later, they were intravenously loaded with HbV (or saline) and CFSE stained splenocytes derived from F344 rat were infused intravenously 24 hours later.

による二次刺激によっても、KLH 特異的メモリーT細胞数あるいは活性は、低下することなくコントロールと同等に残存していることを強く示唆していると思われる。

輸血に際して、経静脈的に生体に注入されるアロ細胞の排除に脾臓などの網内系の細胞が重要な役割を担っている。そこで、HbVの投与下で、アロ細胞の血中消失率が影響を受けるか否かについて検討した。自己の脾細胞をCFSEで染色して、静注した場合の半減期が5日前後であったのに対して、アロ脾細胞を輸注した場合には、おおよそ1日であった。アロ脾細胞の輸注前にHbVをあらかじめ投与した場合にも同じくおおよそ1日であった。この事は、HbVの投与はアロ細胞の血中消失率へ影響しないことを示唆している。あらかじめアロ脾細胞で免疫しておいたラットに於いても、アロ脾細胞の消失時間はHbVの前投与の有無にかかわらず、投与後速やかに血中から消失した。従って、アロ細胞の消失という観点から見ても、HbV投与の影響は認められないと判断される。

以上のことから、HbV投与によってもin vivoの免疫応答（抗体産生反応）あるいは脾のアロ細胞除去能は影響を受けないことが示唆された。

E. 結論

HbVの投与後に脾細胞の免疫応答能をex vivoの系でみると、HbVを貪食した未熟マクロファージが免疫抑制効果を発揮して、一過性にT細胞の増殖反応を抑制する。しかしながら、in vivoの免疫応答機能の指標としてのKLH抗原に対する抗体の産生反応は抑制されないことが判明した。またHbV投与下でのKLH抗原刺激でも、KLH特異的メモリーT細胞が長期にわたり存在している事も確かめられた。従って、HbV投与が免疫機能へ重大な影響を及ぼす可能性は低いと思われる。

1.1. ヘモグロビン小胞体 (HbV) 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・毒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) を健常動物や大量出血時への投与において、HbV投与による生化学的パラメーター、血行動態、免疫系への影響、さらには体内動態特性等に関する結果からHbVの有用性・安全性に関する基礎知見が得られている。しかしながら、赤血球代替物であるHbVは万人への投与が想定されるため、様々な臨床状況を想定した状態での安全性試験を試みる必要があると考えられる。

特に、肝障害を基礎疾患に持つ患者は凝固系システムの破綻により大量出血を惹起する可能性が高く、HbV投与が想定される。その一方で、HbVは肝代謝・排泄型薬物の一種であるため、肝疾患時にHbVの代謝・排泄性が変化すると生体内長期蓄積性などが起こり、予期せぬ副作用を誘発することが懸念される。

また、HbVを現行の輸血システムで臨床使用を考えた場合、HbVの頻回投与は十分に考えられる。近年、リポソーム製剤を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) が報告されており、HbV頻回投与時における体内動態特性の把握はHbVの最適投与設計を行う上で有用な情報になると考えられる。

さらに、これまでの検討は齧歯類を中心とした小中動物を用いた試験結果であり、霊長類での安全性評価は未だ行われていない。臨床試験を控えたHbVにとって、霊長類における安全性試験結果は、ヒトへHbV投与後の安全性を予測するのに有用になるだけでなく、臨床試験を遂行する際のプロトコール (評価項目やモニタリング期間など)

作成の重要な基盤情報になると考えられる。

そこで、(i) HbVの肝疾患時を想定し、四塩化炭素 (CCl₄) 誘発慢性肝障害ラットモデルにおける体内動態評価、(ii) 40% 出血性ショックモデルラットにHbVを1400 mg Hb/kgで頻回投与した際の体内動態評価、(iii) カニクイザルにHbVを臨床推奨量である1400 mg Hb/kgで投与した際の安全性評価を行った。

B. 研究方法

1. 動物

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (6週齢、180~200 gまたは3週齢、約50 g) は九動より購入し、1週間の予備飼育後に使用した。

カニクイザル (オス、4~8才、5.57~5.93 kg) は、実験開始前10日間を馴化期間とし、飼育環境・投与及び採血条件に慣れさせた。

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または株式会社新日本科学安全研究所の動物実験委員会により承認を受け、実験を施行した。

3. 出血性ショックモデルラットの作製

SD系雄性ラットラット (180~200 g) 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) より規定量の脱血を行い、全血液量の40%の血液を脱血することで作製した。

4. CCl₄ 誘発慢性肝障害モデルラットの作成

SD系雄性ラット (約50 g) にミネラルオイルに溶解したCCl₄ (CCl₄ : mineral oil = 1 : 4) を400 mg/kgの投与量で週3回、8週間腹腔内投与し作成した。モデルの妥当性はChild-Pugh Class分類の

各評価項目のスコアの合計値より求めた。

5. 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。

6. ³H-HbV 投与液の調製

HbV 800 μL と cholesterol, [1,2-³H(N)]- 20 μL を混合し、24 時間室温で放置することにより ³H 標識を行った。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、rHSA (5g/dL) を添加することで浸透圧の調節を行った。

7. CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデルにおける体内動態実験

CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデルにエーテル麻酔下、左大腿静脈から ³H-HbV を 1400 mg Hb/kg で投与し、規定時間ごとに尾静脈から採血を行った。得られた血液、血漿及び超遠心処理後に得られた上清のそれぞれ 50 μL を、soluene-350 / イソプロピルアルコール (1 : 1) 混合液 500 μL で可溶化後 (50°C, 24 時間)、過酸化水素で脱色し、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) 8 mL を加え、放射活性を測定した (LSC-5121)。摘出した臓器は、秤量した後、その一部を soluene-350 1 mL で可溶化後 (50°C, 24 時間)、血液と同様の処理により放射活性を測定した。尿・糞については、代謝ゲージにより経時的に採尿・採糞を行い、その一部を臓器と同様の処理により放射活性を測定することで評価した。

8. 出血性ショックモデルラットにおける体内動態実験

甲状腺への ¹²⁵I の蓄積を防ぐために、実験動物

は体内動態実験開始 1 週間前よりヨードブロックを行った。出血性ショックを誘起後、非標識 HbV 1400 mg Hb/kg で蘇生した。蘇生後 4 日目及び 7 日目に ¹²⁵I-HbV を再投与した。¹²⁵I-HbV 投与後、経時的に尾静脈から採血し、血漿を得た。血漿に 1% ウシ血清アルブミン溶液及び 40% トリクロロ酢酸を加え、遠心分離を行い、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。血液の最終サンプリング後、放血致死させ組織を摘出し、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より測定した。

9. カニクイザルにおける体内動態実験

HbV 投与前、投与直後、投与終了後 10, 30 分、1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 168, 336 時間に大腿静脈から採血した。直ちに遠心処理を行い、血漿を得た。HbV 血漿中濃度は、血漿中のヘモグロビン濃度をヘモグロビンテストワコーにより測定することで評価した。

10. 抗 HbV IgG 及び IgM の検出

出血性ショックを誘起後、非標識 HbV 1400 mg Hb/kg で蘇生したラットから蘇生後 7 日目まで各日採血を行い、血漿を得た。超遠心処理により、残存 HbV を除去し上清を血漿サンプルとした。

96well プレートに空小胞体を固定化し、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、490 nm の吸光度で評価した。

11. カーボンクリアランス

CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデルまたは非標識

HbV 1400 mg Hb/kg で蘇生した出血性ショックモデルラットの左大腿静脈に挿入したポリエチレンチューブからカーボン溶液を投与した。投与後、左大腿静脈より採血し、得られた血液 50 μ L を 0.1 % 重炭酸ナトリウム溶液 5mL に溶解させ、吸光度 (675 nm) を測定した。

12. 補体価の測定

出血性ショックを誘起後、非標識 HbV 1400 mg Hb/kg で蘇生した SD ラットより蘇生後 7 日目まで各日採血を行い、血漿を得た。残存 HbV を除去するために超遠心処理を行い、上清を測定に用いた。補体価の測定は株式会社 SRL に委託した。

13. 生化学パラメータの測定

CCl₄ 誘発慢性肝障害モデルラットの尾静脈より血液を採取し、直ちに、Ammonia-Test-Wako kit を用い、血中アンモニアの測定を行った。また、残りの血液は遠心分離 (3000 rpm、10 分間) により血漿を回収し、測定に用いた。生化学パラメータの測定は、株式会社 SRL に委託した。

カニクイザルの実験では規定日に大腿静脈から採血し、遠心分離を行い血清を得た。さらに、得られた血清を超遠心分離処理し、HbV を沈殿・除去させ、上清を用い 12 項目の検査値の測定を行った。

14. 血液ガス

カニクイザルに HbV 投与前、投与終了後 1, 3, 7, 14 日目に大腿動脈より採血し、i-STAT 300F を用い、酸素分圧 (pO₂)、炭酸ガス分圧 (pCO₂)、pH を測定した。

15. 血圧測定

カニクイザルに HbV 投与前、投与終了後 1, 6 時間、1, 3, 7, 14 日目に無麻酔下で全自動血圧測定装置を用い、上腕部から測定した。

16. 病理組織学的検査

CCl₄ 誘発慢性肝障害モデルラット作成終了後、肝臓を摘出し、4 % パラホルムアルデヒドに浸し、固定した。その後、厚さ 5 μ m の切片となるようスライスし、パラフィン包埋切片を作製した。

16-1. H.E.染色 (Hematoxylin-Eosin stain)

脱パラフィン後、流水水洗し、ヘマトキシリン液で 4 分間染色した。再び流水水洗した後、エオシン液で 60 秒間染色し、流水水洗、脱水、透徹、封入を行い、組織像を観察した。

16-2. EVG 染色 (Elastica van Gieson stain)

脱パラフィン後、ワイゲルト・レゾルシンフクシン液で 6 時間染色し、100 % エタノールで分別を行った。流水水洗後、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液で 5 分間染色し、再び流水水洗し、ワンギーソン液 (1.25 w/v % picric acid, 1 % acid fuchsin solution) で 10 分間染色した。その後、分別、脱水、透徹、封入を行い、組織像を観察した。また、線維化組織面積率の測定は、100 倍顕微鏡下でランダムに 30 枚の画像を撮影し、Lumina Vision version 2.2 により画像 1 枚毎の線維化面積率を算出し、その平均値を線維平均含有率とした。

C. 結果および考察

1. HbV の肝疾患時における体内動態評価

1-1. CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデルの作成

血漿中肝機能マーカーである AST、ALT、 γ -GTP、総ビリルビン及びアンモニアを測定した。その結果、健常時に比べ、CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデル群では AST、ALT、 γ -GTP、総ビリルビン及びアンモニアの有意な上昇が確認された (Fig. 1)。

次に、Figure 2A・B には H. E. 染色の結果を示す。その結果、CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデル群では明らかな形態変化が観察された。また、慢性肝障害時には肝臓の線維化が起こることが知られているため、線維化部分を特異的に染色する EVG 染色を行ったところ、CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデル

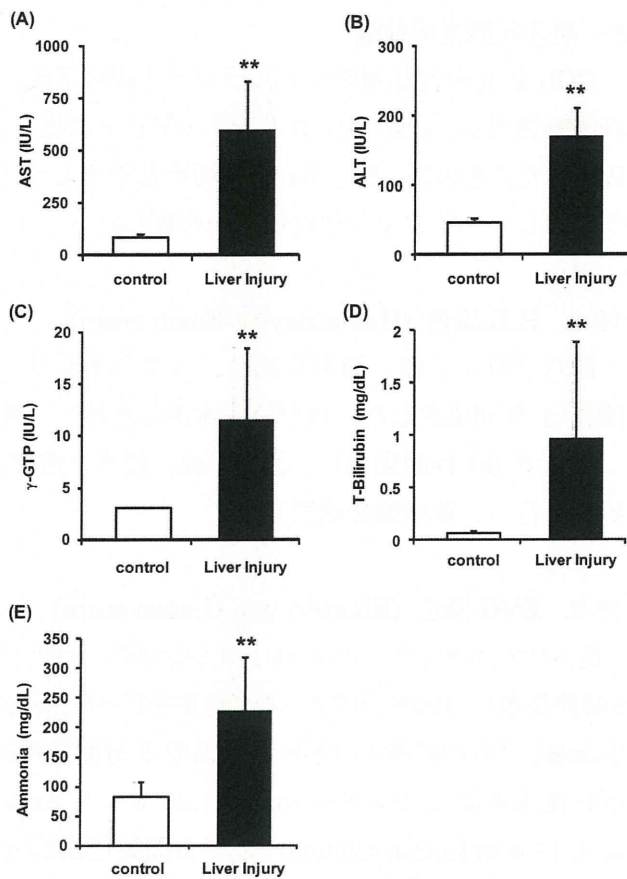


Figure 1. Plasma clinical chemistry tests at 8 weeks after exposure to CCl₄ in liver injury rats. Each column represents the mean ± SD (normal; n = 5, liver injury; n = 6-9). ***p* < 0.01 compared with normal rats group.

群では明らかな線維化が確認された (Fig. 2C・D).
 そこで、この線維化組織面積率を算出したところ、
 CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデル群では肝組織全
 体の約 11 % が線維化していた (Fig. 2E).

さらに、ヒトの肝硬変重症度の指標として臨床で汎
 用されている Child-Pugh class 分類による評価を行っ
 た。その結果、ビリルビン (Score 1-2)・プロトロンビン
 活性値 (Score 1-2)・アルブミン値 (Score 2)・脳症
 (Score 1)・腹水 (Score 2-3) の結果から、合計 Score
 が 7-10 となった (Table 1)。これらの結果より、今回作
 成した CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデルは、Class B-
 C に相当する肝機能障害を示し、ヒトにおいて、中等
 度から重度の肝障害に相当するものと推定された。

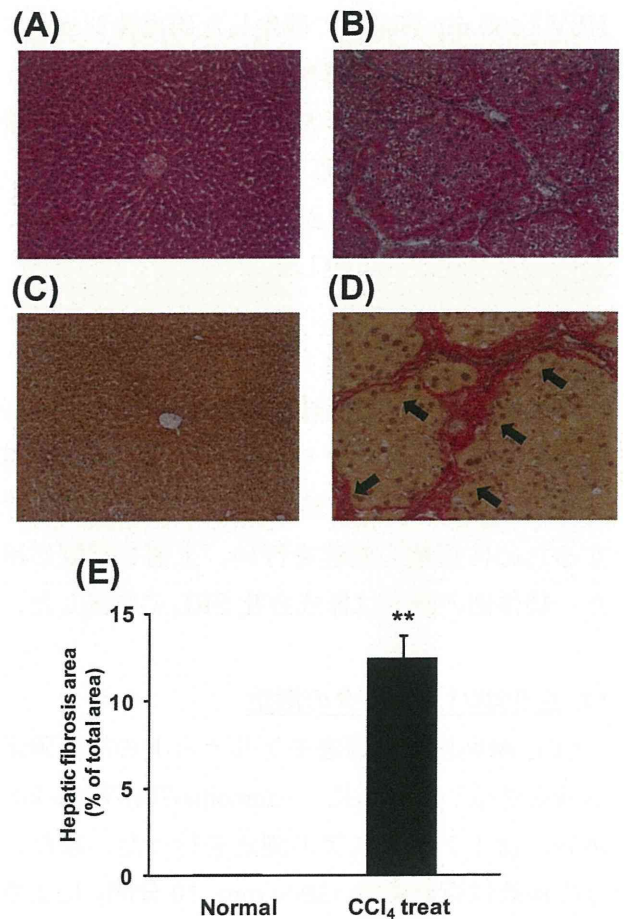


Figure 2. Light micrographs of livers stained with H&E and EVG stains: Normal group (A) and CCl₄ treated (B) group (x100) stained with H&E. Normal group (C) and CCl₄ treated (D) group (x100) stained with EVG. The arrows indicate fibrosis areas. (E) Hepatic fibrosis area in the normal (n=6) and CCl₄ treated (n=6) groups. The fibrotic area was calculated as the mean of thirty, randomly selected fields of vision in each liver section, based on EVG staining. Data are expressed as the mean ± SD. ***P* < 0.01

Table 1 Child-Pugh assessment

Parameter	Score
Encephalopathy	None 1
Ascites (mL)	24.1 ± 17.1 2-3
Bilirubin (mg/dL)	0.96 ± 0.93 1-2
Albumin (g/dL)	3.10 ± 0.25 2
Prothrombin activity (%)	51.7 ± 6.6 1-2
total 7-10	

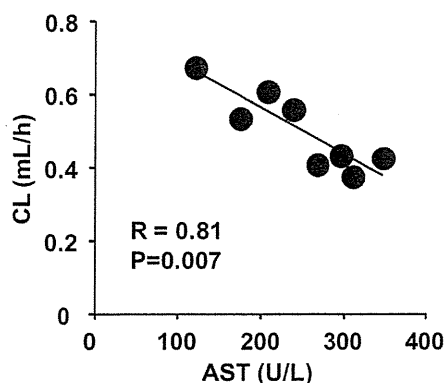


Figure 3. Relationship between plasma AST levels and total clearance (CL) for HbV. The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method ($y = -0.0012x + 0.814$, $r = 0.81$, $p = 0.007$).

1-2. 体内動態評価

1-2.1 血漿中濃度

上記のように作成した CCl_4 誘発慢性肝障害ラットモデルを用い、体内動態評価を行った。 3H -HbV投与後、規定時間ごとに尾静脈から採血を行い、得られた血漿中濃度推移より血中クリアランスを算出したところ、非常に個体差の大きい結果となった (0.51 ± 0.11 mL/hr)。そこで、この個体差は肝障害の程度に依存するのではないかと仮定し、肝機能マーカーの1つであるASTと血中クリアランスの相関をとったところ、良好な負の相関関係を示した (Fig. 3)。

1-2.2 臓器分布

肝臓はHbVの主要分布臓器であるため、Fig. 3で示した肝障害の程度によるクリアランスの変化に肝臓への分布量が影響しているのではないかと考えられる。そこで、肝臓へのHbV分布率とAST値との相関関係の確認を行ったところ、HbV投与後24時間および72時間におけるHbV分布率とAST値には、高い相関関係が確認された (Fig. 4A)。一方、もう1つのHbVの主要分布臓器である脾臓においては、このような相関関係は認められなかった (Fig. 4B)。

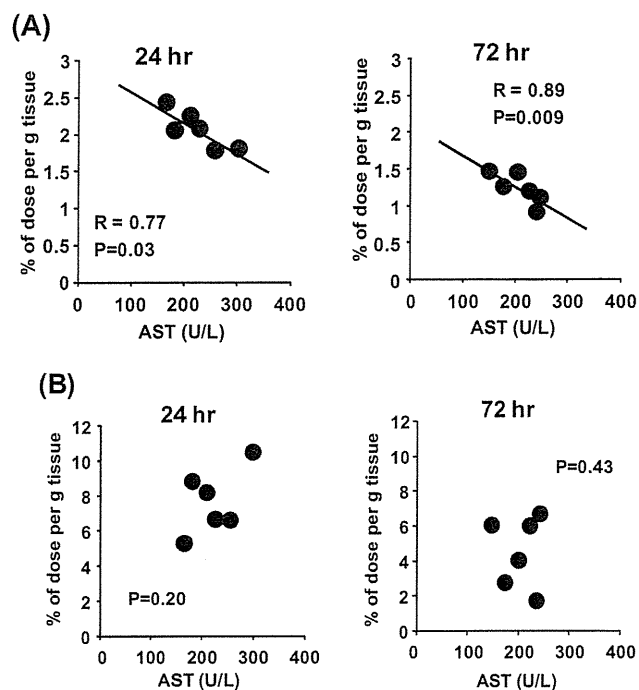


Figure 4. Relationship between plasma AST levels and (A) hepatic or (B) splenic distribution of HbV at 24 hr or 72 hr after the administration of 3H -HbV. The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method (A; 24 hr, $y = -0.0042x + 2.99$, $r = 0.77$, $p = 0.03$, 72 hr, $y = -0.0042x + 2.09$, $r = 0.89$, $p = 0.009$).

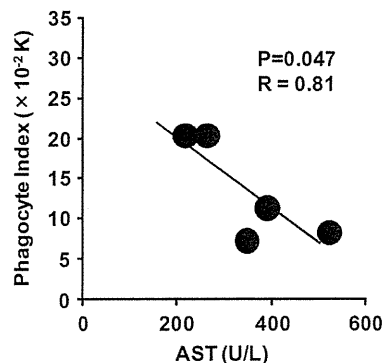


Figure 5 Relationship between plasma AST levels and phagocyte index (K). The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method ($y = -0.00004x + 0.0289$, $r = 0.81$, $p = 0.047$).

1-2.3 代謝能

HbVの代謝には細網内皮系細胞が関与しているため、次に、肝障害の程度により、代謝能の変化についてカーボンクリアランス法により評価した。その結果、AST値の上昇に従い貪食活性が低下することが確認され (Fig. 5)、肝障害の程度によるHbV

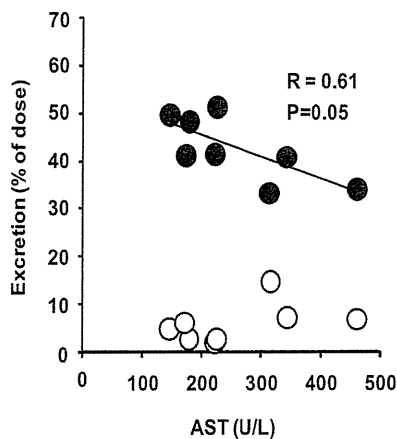


Figure 6. Relationship between plasma AST levels and excretion *via* the feces (closed circle) or urine (open circle). The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method (Feces; $y = -0.0464x + 54.364$, $r = 0.61$, $p = 0.05$).

の体内動態の変動には代謝能の変化が影響していることが強く示唆された。

1-2.4 排泄性

また、肝臓はHbV脂質膜構成成分の排泄臓器でもあり、肝障害がHbV脂質膜構成成分の排泄にも影響を与えることが考えられる。そこで、脂質成分の排泄量について検討を行った結果、尿中排泄量は変動しないものの、糞中排泄は肝障害の悪化に従い排泄率が低下することが確認された (Fig. 6)。

2. 出血性ショックモデルラットにHbV頻回投与時での体内動態評価

2-1. 抗HbV IgM・IgGの産生

ABC現象の誘導には初回投与に呼応して脾臓から分泌される抗リポソーム IgM の産生が必要不可欠である。そこで、出血性ショックモデルラットをHbV (1400 mg Hb/kg) で蘇生後1週間までの経時的な抗 HbV IgG 及び IgM の産生について検討を行った。その結果、抗 HbV IgG は産生されないものの、抗 HbV IgM は蘇生後2日目より産生され始め、蘇生4日後に最大値を示した (Fig. 7)。この結果、出血性ショックモデルラットをHbV (1400 mg Hb/kg) で蘇生し、数日後に再投与するとABC現象が誘発される可能性が示唆された。

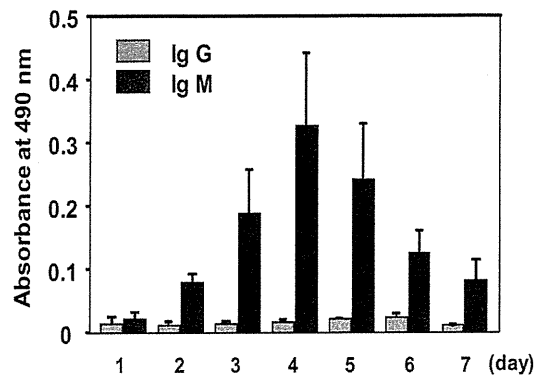


Figure 7. The production of anti-HbV IgG and IgM after resuscitation by HbV in a rat model of hemorrhagic shock. Each bar represents the mean \pm SD ($n = 5$).

2-2. 血漿中濃度推移

そこで、抗 HbV IgM が最大値を示した蘇生4日後及び対照群に蘇生7日後に焦点を絞り、HbV 繰り返し投与時におけるABC現象の誘導について検討を行った。その結果、健常時に比べ、出血性ショックモデルラット蘇生4日及び7日後において、血漿中濃度の急激な低下が確認された (Fig. 8)。

2-3. 臓器分布

次に、 ^{125}I -HbV 投与24時間後における各臓器 (腎臓・肝臓・脾臓・肺・心臓) への分布量を測定した。その結果、出血性ショックモデルラット蘇生4日及び7日後の両群において、肝臓への有意な分布量の増大が確認された (Fig. 9)。

2-4. 補体価

ABC現象は、初回投与に呼応して脾臓から抗リポソーム IgM が分泌され、補体活性が起こることによって2回目投与されたリポソームがオプソニン化され、Kupffer細胞の取り込みが増大し、結果的に、血中濃度の低下が起こる。そこで次に、出血性ショックモデルラットをHbVで蘇生後4日目及び7日目の補体価を測定した。その結果、HbV蘇生後4日目において補体価の有意な低下が観察された。