

分担課題：ヘモグロビン小胞体 (HbV) の体内動態特性に関する検討

主任研究者 小田切 優樹 熊本大学
崇城大学薬学部

名誉教授
教授

研究要旨

(1) 高脂血症モデルとして ApoE 欠損マウスにヘモグロビン小胞体 (HbV) を単回大量投与し、体内動態及び生体蓄積性について評価を行った。ApoE 欠損マウスにトリチウム標識 HbV (^3H -HbV) を 2000 mg Hb/kg で投与したところ、健常動物と同様に HbV の大部分は肝臓・脾臓に分布していた。さらに、投与後 14 日目には、約 5%の放射活性が肝臓において確認されたものの、その他の臓器においては、放射活性はほとんど検出されなかった。また、血漿中においても約 3%の放射活性が確認されたが、目視上において血漿中に HbV は確認されなかったことから、HbV の脂質膜が代謝・排泄される過程において HDL-コレステロールなどに取り込まれた ^3H が検出されていると推測された。

(2) HbV に多くの生理活性を有する一酸化炭素 (CO) を結合させた CO 結合型 HbV (CO-HbV) の特発性肺線維症 (IPF) 治療薬としての可能性を探求した。その結果、CO-HbV 投与により肺線維化の抑制及び肺機能の維持が確認され、CO-HbV は IPF の新規治療薬としての可能性が見い出された。今回得られた知見は、現代の生活習慣病患者及びその予備群の増加を鑑み、生活習慣病の一種である高脂血症時における HbV の安全性 (生体蓄積性) を体内動態学的観点より初めて明らかにするとともに、HbV の CO キャリアとしての有用性を初めて明らかにしており、HbV の臨床使用及び臨床適応疾患の構築に向けた重要な基盤情報になると考えられる。

A. 研究目的

医薬品を開発する過程の中で、前臨床段階として製剤化試験、薬理試験、薬物動態試験、さらには毒性試験など多くの段階を経て、その有効性と安全性を確立していく必要がある。我々はこれまでに、人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体 (HbV) の生体内挙動 (*Drug Metab Dispos.* 2009, 2011; *Drug Metab Rev.* 2011; *J Drug Metab Toxicol.* 2012) や大量出血時 (*J Control Release.* 2009)、肝硬変時 (*Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; *J Pharm Sci.* 2011)、妊娠時 (*Life*

Sci. 2012) などの一般的な薬物の安全性評価に準じて、HbVの安全性を明らかにしてきた。しかしながら、HbVは赤血球代替物であるため多種多様な罹患者へ投与することになる。加えて、HbVの1回あたりの投与量は数百mL～数Lにおよび、心血管疾患等のリスクファクターと成り得る脂質成分 (特にコレステロール) を大量に体内へ投与することにもなる。そのため、HbVを投与した後に脂質成分、特にコレステロール、は如何なる場合においても安全に代謝・排泄されることが求められる。しかしながら、これまでの評

価は一般的な薬物と同様の安全性評価のみであり、生体蓄積性を示す可能性が想定される疾患時における安全性評価は乏しい。実際に、これまでに開発されてきた人工酸素運搬体であるパーフルオロカーボン (PFC) では1年以上にわたる臓器蓄積を示した結果、副作用を誘発した。

また、近年、一酸化炭素 (CO) は抗炎症作用や抗酸化作用などの多面的な生理活性作用を持つことから新規医療ガスとして臨床応用が期待されている。しかしながら、臨床応用に際しては、ガス分子であるCOの生体内コントロールを制御する必要があり、そのためには安全かつ安定にCOを供給できるキャリアが必須となる。そこで我々は、キャリアとしてCOに高い親和性を有するHbVに着目した。これまでにCO結合型HbV (CO-HbV) を用いたin vivoの検討において、生体内に投与されたCO-HbV中の一部のCOは最終的に肺を通過して呼気中に排出されることが動物実験で確認されている。したがって、CO-HbVを用いた肺へのCO送達が可能であると考えられる。

以上の背景より、本研究では、まず初めに脂質代謝に異常を持つ場合を仮定し、高脂血症モデルとしてApoE欠損マウスを用いHbVの安全性を体内動態学的観点より評価を行った。次に、肺疾患の中でも難治性疾患であり新規薬物の開発が切望されている特発性肺線維症 (IPF) に対するCO-HbVの有用性評価を行った。

B. 研究方法

1. 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、崇城大学実験動物倫理委員会のもとに、実験を施行した。

2. ApoE欠損マウスにおけるHbVの体内動態実験

2-1. 動物

実験動物はApoE欠損マウス (オス、7週齢) は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育後に8週齢で実験に使用した。

2-2. ^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。

2-3. 投与方法及び投与量

ApoE 欠損マウスに非絶食、エーテル麻酔下において、 ^3H -HbV 2000 mg Hb/kg を尾静脈より投与した。投与後 1 日目、3 日目、7 日目及び 14 日目に血液、臓器 (腎臓、肝臓、脾臓、心臓、肺) を回収した。

2-4. 採血方法、放射活性の測定・分析

ヘパリン処理した注射筒を用いて、投与後 1 日目、3 日目、7 日目及び 14 日目に下腹静脈から採血を行い、遠心分離により血漿を採取した。得られた血漿 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。

3. CO-HbV の IPF への有用性評価

3-1. 動物

実験動物は Sea-ICR マウス (オス、6 週齢) は九動より購入し実験に使用した。また、実験期間中は水及び固形飼料を自由に摂水及び摂食させた。

3-2. IPF モデルマウスの作成

Sea-ICR マウスに非絶食、抱水クロラル麻酔下において、ブレオマイシン (5 mg/kg) を経気道投与することにより作成した。

3-3. CO-HbV の投与

ブレオマイシン投与 30 分前及び 1 日後に生理食塩水、HbV (1400 mg Hb/kg) または CO-HbV (1400 mg Hb/kg) を尾静脈より投与した。

3-3. CO-HbV の投与

IPF モデルマウスにサンプル投与後、3 日目に肺胞洗浄液中の細胞数を、14 日目に肺線維化の評価 (Masson's trichrome 染色及びヒドロキシプロリン定量) 及び努力肺活量の測定を行い、治療効果の評価を行った。また、それぞれの評価は、定法に従い行った。

C. 結果および考察

1. ApoE欠損マウスにおけるHbVの体内動態

1-1. 一般状態

すべてのApoE欠損マウスにおいてHbV投与時に特記する異常行動等は確認されなかった。また、HbV投与後から観察終了日 (投与後14日目) まで、HbV投与によるショック症状や瀕死状態あるいは死亡した例はなかった。

1-2. 体内動態

HbVを2000 mg Hb/kgでApoE欠損マウスに投与し、1, 3, 7, 14日後の血漿中及び各臓器 (腎臓、肝臓、脾臓、心臓、肺) への分布量を観察し、主要分布臓器及び蓄積性について評価した。

その結果、これまで明らかとなってきた健常マウスと同様にHbVの大部分は肝臓に分布していた (Fig. 1)。また、臓器g当たりの分布量を算出したところ、脾臓において高い分布を示した (Fig. 2)。これまでの健常動物を用いた検討において、HbVはクッパー細胞、脾臓マクロファージ

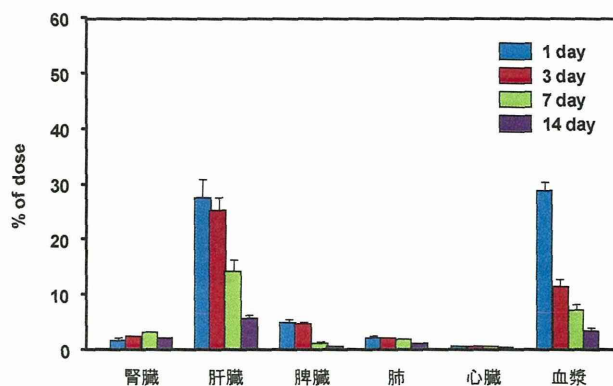


Figure 1 Tissue distributions (% of dose) of ^3H -HbV at 1, 3, 7, 14 day after administration to ApoE deficient mice at a dose of 2000 mg Hb/kg. Each point represents the mean $\pm$ SD (n=5).

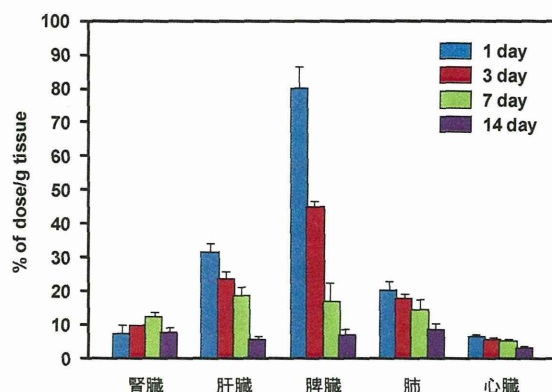


Figure 2 Tissue distributions (% of dose/g tissue) of ^3H -HbV at 1, 3, 7, 14 day after administration to ApoE deficient mice at a dose of 2000 mg Hb/kg. Each point represents the mean $\pm$ SD (n=5).

などの細網内皮系細胞に取り込まれ、代謝を受けることが明らかとなっている。そのため、高脂血症時においても、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、投与後14日目には、肝臓より約5%の放射活性が確認されたものの、その他の臓器においては放射活性はほとんど検出されなかった。

また、血漿中においても約3%の放射活性が確認された。これは、HbVの脂質膜が代謝・排泄される過程においてHDL-コレステロールなどに取り込まれ代謝・排泄されている過程において検出されたと推測される。実際に、目視上において血漿中にHbVは確認されなかったことから、投

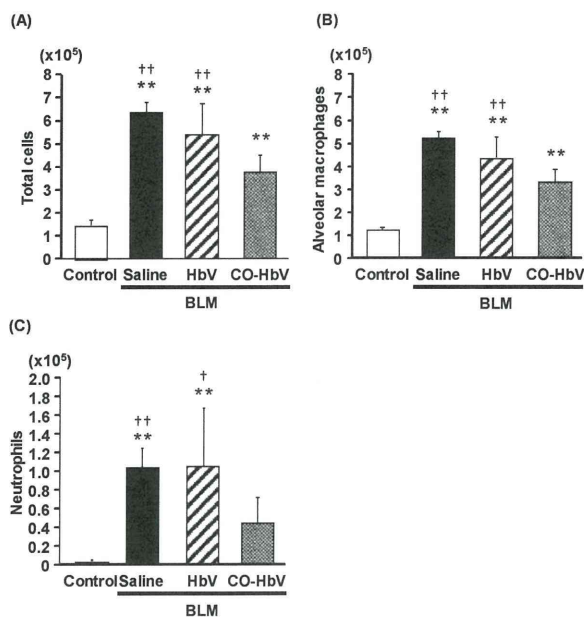


Figure 3 Effect of CO-HbV on cells in bronchoalveolar lavage fluid in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice. The number of inflammatory cells including (A) total cells, (B) alveolar macrophages and (C) neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid on day 3. These inflammatory cells were determined on day 3. Each value represents the mean $\pm$ s.d. ($n=3-6$). ** $P<0.01$ versus control. †† $P<0.01$ versus CO-HbV. † $P<0.05$ versus CO-HbV.

与後14日目までには、HbV自身は完全に分解され、血中から消失している可能性が示唆された。これらの結果より、HbVは高脂血症時に大量単回投与 (2000 mg Hb/kg) しても投与後14日目には生体内より殆ど消失しており、生体蓄積性は少ないと推測された。

2. CO-HbVのIPFへの有用性評価

2-1. 肺胞洗浄液の評価

炎症性細胞の浸潤について気管支肺胞洗浄液中の細胞数を比較したところ、ブレオマイシン投与により生理食塩水投与群において総細胞数の有意な増加がみられた (Figure 3A)。また、細胞

種別の評価を行ったところ、浸潤しているのは主に肺胞マクロファージ (Figure 3B) と好中球 (Figure 3C) が浸潤していた。興味深いことに、HbV投与群ではこれら炎症性細胞の浸潤は抑制されていなかったのに対して、CO-HbV群は、そ

これらの浸潤を抑制していた (Figure 3)。

2-2. 肺線維化の評価

次に、肺線維化の評価を、マッソントリクローム染色と、ヒドロキシプロリンの定量により行った。マッソントリクローム染色の結果、生理食塩水投与群及びHbV投与群において明らかな見られた顕著な線維化の進行が見られたのに対し、CO-HbV投与群では、その進行が抑制が確認されていた (Figure 4A)。また、ヒドロキシプロリンを定量した結果、マッソントリクローム染色の結果と同様に、生理食塩水投与群及びHbV投与群においては有意な産生の増加が確認されたのに対して、CO-HbV投与群においてその抑制が確認された (Figure 4B)。以上の結果より、線維化の抑制効果がCOに起因していると推定された。

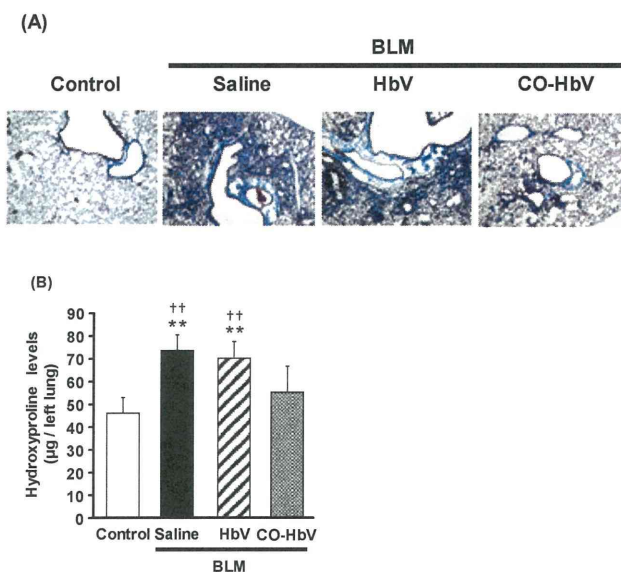


Figure 4

(A) Histopathologic evaluation at after saline, HbV or CO-HbV treatment on day 14 in BLM-induced pulmonary fibrosis mice.

Sections of pulmonary tissue were prepared on day 14 and subjected to Masson trichrome staining.

(B) Hydroxyproline levels in left lung at after saline, HbV or CO-HbV treatment on day 14 in BLM-induced pulmonary fibrosis mice.

The pulmonary hydroxyproline level was done on day 14. Each value represents the mean $\pm$ s.d. ($n=3-7$). ** $P<0.01$ versus control. †† $P<0.01$ versus CO-HbV.

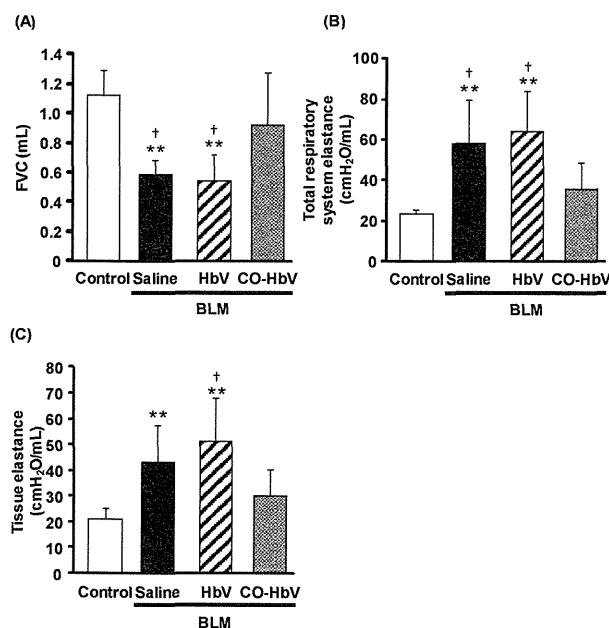


Figure 5 The lung mechanics and respiratory functions after saline, HbV or CO-HbV treatment on day 14 in BLM-induced pulmonary fibrosis mice. Forced vital capacity (A), total respiratory system elastance (B) and tissue elastance (C) were determined on day 14. Each value represents the mean $\pm$ s.d. (n=4-5). **P<0.01 versus control. ††P<0.01 versus CO-HbV. †P<0.05 versus CO-HbV.

2-3. 肺機能評価

最後に、CO-HbV投与による肺機能への効果について評価を行った。評価項目としては、肺線維症をはじめとする拘束性障害でその値が低下することからIPF患者に対する治療効果の指標として用いられている努力肺活量 (FVC) により評価を行った。その結果、生理食塩水投与群及びHbV投与群では線維化に伴うFVCの低下が認められるのに対し、CO-HbV投与群では、その抑制が確認された (Figure 5A)。また、肺全体及び肺胞の硬さを測定した結果、FVCと同様にCO-HbV投与群では、肺機能悪化の抑制が確認された (Figure 5B and C)。したがって、CO-HbV投与によりIPFに対する治療効果が認められた。

D. 結論

本研究結果のみでHbVが高脂血症時に安全であると断定することはできないが、脂質代謝に異常をきたしている場合にHbVを単回大量投与

(2000 mg Hb/kg) しても生体蓄積性は殆ど無く、少なくとも体内動態学的観点では安全であると考えられる。今後、血液学的評価や組織学的評価を含めた安全性評価を行っていくことで、脂質代謝異常時 (高脂血症時) における詳細な安全性を明らかにしていけると考えられる。これらの検討項目については、次年度に行っていく予定である。

加えて、本研究ではCO-HbVがIPFに対して有効性を示した。IPFは、原因不明の肺線維症であり、慢性かつ進行性の経過をたどり、最終的には呼吸不全を来し死に至る予後不良な難治疾患であり、生存期間の中央値は2.8年であり、5年生存率はわずか20%と非常に低いことが報告されている。臨床現場では、治療薬としてステロイドや免疫抑制剤、さらには抗線維化剤であるピルフェニドンが使用されているが、その効果は不十分であり、より有効な治療薬の開発が切望されている。本研究結果より、CO-HbVは、IPFの新規治療薬として有用であり、新規治療薬候補として有望ではないかと考えられる。

以上より、HbVのApoE欠損マウスを用いた体内動態実験より、HbVは高脂血症時においても生体蓄積性は少ないことが示唆された。本研究は、現代のライフスタイルの変化を鑑みた安全性評価であり、医薬品の開発においてこれまでに類を見ない先導的な評価と言える。また、COは抗炎症作用、抗酸化作用などの多くの生理機能を有しており、HbVは、COの有用なキャリアとなりうることから、CO-HbVはIPFの新規治療薬としてだけでなく、炎症や活性酸素が関連する多くの疾患の治療薬候補として有望ではないかと考えられる。来年度以降にCO-HbVの更なる可能性について追及していこうと考えている。

本研究結果及びこれまで積み重ねられているHbVのデータを考え合わせると、HbVの赤血球代替物としての安全性かつ有用であるばかりでなく、COキャリアとしてHbVが様々な疾患に対し

でも安全に使用できることを示しており、HbVは多くの疾患治療薬として期待できるのではないかと考えられる。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 主な論文発表

1. Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, Kodama A, Nagao S, Watanabe H, T G Chuang V, Otagiri M, Maruyama T. Albumin fusion prolongs the antioxidant and anti-inflammatory activities of thioredoxin in mice with acetaminophen-induced hepatitis. *Mol Pharm.* (2014) *in press*
2. Sato H, Chuang VT, Yamasaki K, Yamaotsu N, Watanabe H, Nagumo K, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Hirono S, Otagiri M, Maruyama T. Differential effects of methoxy group on the interaction of curcuminoids with two major ligand binding sites of human serum albumin. *PLoS One.* (2014) 9(2):e87919.
3. Ishima Y, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Otagiri M. Poly-s-nitrosated albumin as a safe and effective multifunctional antitumor agent: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Biomed Res Int.* (2013) 353892.
4. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One.* (2014) 9(1):e85216.
5. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Kondo M, Chuang VT, Wu Q, Endo M, Ishima Y, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* (2014) 1840(3):1152-62.
6. Chuang VT, Otagiri M. Photoaffinity labeling of plasma proteins. *Molecules.* (2013) 18(11):13831-59.
7. Taguchi K, Jono H, Kugimiya-Taguchi T, Nagao S, Su Y, Yamasaki K, Mizuguchi M, Maruyama T, Ando Y, Otagiri M. Effect of albumin on transthyretin and amyloidogenic transthyretin Val30Met disposition and tissue deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. *Life Sci.* (2013) 93(25-26):1017-22.
8. Watanabe H, Sakaguchi Y, Sugimoto R, Kaneko KI, Iwata H, Kotani S, Nakajima M, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p-cresyl sulfate, a uremic toxin. *Clin Exp Nephrol.* (2013) *in press*
9. Taguchi K, Ujihira H, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T. Pharmacokinetic study of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model. *J Pharm Sci.* (2013) 102(10):3852-9.

10. Nishijima M, Kato H, Fukuhara G, Yang C, Mori T, Maruyama T, Otagiri M, Inoue Y. Photochirogenesis with mutant human serum albumins: enantiodifferentiating photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate. *Chem Commun.* (2013) 49(67):7433-5.
11. Altaf A, Aldawsari H, Banjar MZ, Anraku M, Iohara D, Otagiri M, Uekama K, Hirayama F. Preparation of soluble stable C₆₀/human serum albumin nanoparticles via cyclodextrin complexation and their reactive oxygen production characteristics. *Life Sci.* (2013) 93(7):277-82.
12. Taguchi K, Ujihira H, Ogaki S, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Okamura Y, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T. Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41(8):1584-91.
13. Yamasaki K, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(12):5435-43.
14. Anraku M, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(12):5465-72.
15. Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka K, Mizushima T, Otagiri M, Maruyama T. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther.* (2013) 345(2):271-83.
16. Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, Otagiri M, Maruyama T. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin. *Nitric Oxide.* (2013) 30:36-42.
17. Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, Otagiri M. Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(4):2917-23.
18. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int.* (2013) 83(4):582-92.
19. Nishi K, Kobayashi M, Nishii R, Shikano N, Takamura N, Kuga N, Yamasaki K, Nagamachi S, Tamura S, Otagiri M, Kawai K. Pharmacokinetic alteration of (99m)Tc-MAG3 using serum protein binding displacement method. *Nucl Med Biol.* (2013) 40(3):366-70.
20. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. A human serum

albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. *Kidney Int.* (2013) 83(3):446-54.

21. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome P450 impairment in hemorrhagic-shock rats. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41(1):141-8.

22. S. Nagao, K. Taguchi, H. Sakai, R. Tanaka, H. Horinouchi, H. Watanabe, K. Kobayashi, M. Otagiri, T. Maruyama. Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles as a potential therapeutic agent for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials* (in press)

2. 主な学会発表

1. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. Kaori Watanabe, Yu Ishima, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, Masaki Otagiri, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

2. Therapeutic impact of human serum albumin-thioredoxin fusion protein, long-acting anti-oxidative and anti-inflammatory modulator, against acetaminophen-induced acute liver failure. Ryota Tanaka, Hitoshi Maeda, Azusa Kodama, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Toru Maruyama, Masaki Otagiri (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

3. Carbon monoxide bound red blood cells protect the expression of hepatic cytochrome P450 after

resuscitation from hemorrhagic shock via inactivation of Kupffer cells. Shigeru Ogaki, Kazuaki Taguchi, Hitoshi Maeda, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

4. Mechanism of enhanced cysteinylolation of Cys34 in human serum albumin in chronic liver disease. Kohei Nagumo, Tadashi Imafuku, Naoyuki Yamada, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Motohiko Tanaka, Yutaka Sasaki, Masaki Otagiri, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

5. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. Hiroshi Watanabe, Azusa Kodama, Ryota Tanaka, Hisae Tanaka, Victor Tuan Giam Chuang, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

6. Safety and pharmacokinetic evaluation after a massive intravenous infusion of hemoglobin-encapsulated liposome (Hemoglobin-vesicles) in cynomolgus monkeys. Kazuaki Taguchi, Hiroshi Watanabe, Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Koichi Kobayashi, Toru Maruyama, Masaki Otagiri (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

7. Preclinical studies of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier in non-human primate. Kazuaki Taguchi, Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Koichi Kobayashi, Toru Maruyama, Masaki Otagiri (The XIVth

International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Chengdu, China, 2013/10/18-21)

8. Artificial red cells (hemoglobin-Vesicles) for blood substitutes and oxygen therapeutics. Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Horoshi Azuma, Masaki Otagiri, Koichi Kobayashi (The XIVth International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Chengdu, China, 2013/10/18-21)

9. Albumin -Thioredoxin Fusion Protein is Effective in Suppressing Lung Injury. Masaki Otagiri (9th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, Orlando, 2013/5/12-15)

10. Development of recombinant serum albumin. Masaki Otagiri (The International Liver Congress 2013 48th annual meeting of the European association for the study of the liver, Amsterdam, the Netherlands, 2013/4/24-28)

11. 健常及び病態時における血小板代替物 H12(ADP)リポソームの頻回投与が体内動態に及ぼす影響 橋本麻衣、大柿滋、氏平隼人、田口和明、渡邊博志、藤山淳史、土井麻美、池田康夫、武岡真司、半田誠、小田切優樹、丸山徹 (第 20 回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

12. 一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の特発性肺線維症治療薬としての創製 田口和明、永尾紗理、丸山徹、小田切優樹 (第 20 回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

13. 出血性ショック輸血後の肝障害に対する一酸化炭素付加赤血球の保護メカニズム 丸山

徹、大柿滋、田口和明、前田仁志、異島優、渡邊博志、小田切優樹 (第 20 回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

14. 妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた治療法の開発 太田英伸、李コウ、田口和明、大柿滋、泉仁美、稲垣真澄、岡村州博、小田切優樹、酒井宏水、八重樫伸生 (第 20 回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

15. クッパー細胞選択的チオール送達によるアセトアミノフェン肝障害治療法の開発 前田仁志、平田憲史郎、渡邊博志、異島優、末永綾香、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

16. アルブミン-チオレドキシシン融合体によるシスプラチン腎症予防効果 小玉あずさ、田中遼大、渡邊博志、異島優、深川雅史、小田切優樹、丸山 徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

17. 高分子抗癌剤の腫瘍集積性を高める S-ニトロソ化アルブミンダイマーの EPR 効果増強作用 異島優、方軍、前田浩、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

18. クルクミンと血清アルブミンの相互作用と抗酸化活性への影響 佐藤弘樹、異島優、渡邊博志、山崎啓之、安楽誠、小田切優樹、丸山 徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

19. インフルエンザ肺障害に対するニューキノロン系抗菌薬の有効性評価 榎木裕紀、田中遼大、宮本洋平、異島優、渡邊博志、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第 28 年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

臓学会学術総会, 東京, 2013/5/10-5/12)

20. 骨髄標的化エリスロポエチンの製剤設計と
腎性貧血治療への応用 丸山徹、宮崎裕理、田
口和明、渡邊博志、宗慶太郎、田中元子、松
下和孝、深川雅史、小田切優樹 (第56回日本腎

G. 知的財産権の出願。登録状況 (予定を含む)
該当無し。

分担研究報告書

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の実用化を目指す研究

分担課題：1) ヘモグロビン小胞体(HbV)が

サイトカイン・ケモカインの産生動態に与える影響について

2) ヘモグロビン小胞体(HbV)投与後の

脾マクロファージの遺伝子発現プロファイルの変化について

分担研究者	東 寛	旭川医科大学小児科 教授
研究協力者	藤原 満博	北海道赤十字血液センター 製剤開発課長
	酒井 宏水	奈良県立医科大学化学教室 教授

研究要旨

循環血液量の20% v/vに相当するポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン小胞体(HbV)あるいはHb分子を内包しない空リポソーム(DPPC-liposome)をラットに投与後、摘出した脾細胞では、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだしている。しかし、T細胞の増殖抑制に伴って、サイトカイン・ケモカインの産生動態がどのように変化しているかは、不明のままであった。本研究では、そのことを明らかにするため、反応系におけるサイトカイン・ケモカインを網羅的に測定した。その結果、リポソームを投与すると産生が増加するものとして、主としてマクロファージが産生する、CC-chemokine, IL-10, TNF- α およびTh1サイトカインであるIFN- γ , IL-2が明らかになった。一方、リポソームの投与の有無に関わらず産生誘導が認められないものとしてIL-1 β , IL-18, Th2 cytokineであるIL-4, 5, 13が明らかになった。また、空リポソームを貪食したマクロファージの遺伝子発現プロファイルをコントロールマクロファージと比較し、貪食後に発現の増強を認める遺伝子群を同定した。

A. 研究目的

我々はこれまでラットの免疫系へのHbVの影響を検討するため、HbV投与後に脾臓を摘出し、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に対する反応性の変化を検討してきた。その結果、HbVおよびHbVを内包しない空リポソームの投与で、一過性にこれらの増殖刺激に対するT細胞の反応性が低下すること、そしてこの低下にNOの産生が関与することを見出している。しかし、反応系における諸々のサイトカインやケモカインの産生

動態がどのような影響をうけるかについては、詳細な検討がなされてこなかった。本研究は、この点を明らかにすることを目的としている。さらに、リポソームを貪食した脾マクロファージの遺伝子発現プロファイルの変化について解析することにより、マクロファージの機能変化を分子生物学的側面から解析することを目的とした。

B. 研究方法

B1. 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(DPPC-liposome) (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。

B2. 培養上清中にサイトカイン・ケモカインの測定

培養開始後、1日目、2日目、3日目に上清の一部を回収し、アッセイまで-20 $^{\circ}$ Cに凍結保存した。測定は、Bioplex pro rat cytokine assay panelを用いて、網羅的に測定した。即ち、IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-17, IL-18, MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (XXA3), MIP-3 α (CCL19), RANTES (CCL5), TNF- α , の16種類である。実験は異なる日に3回行った。1回目の実験で、培養72時間まで経時的に測定を試みた。2回目、3回目の実験では、その結果を踏まえて培養開始72時間後の培養上清中のサイトカイン・ケモカインを測定した。測定はすべてtriplicateで行なった。

B3. 脾細胞からのCD11b/c陽性、HLA-class II陰性細胞の分離とRNAの抽出

磁気ビーズを用いた純化操作によりCD11b/c 陽性細胞rich 分画を採取した。得られた分画の

CD11b/c陽性細胞の割合は、純化前の数%から純化後は50%前後に高めることができた。この細胞からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析に用いた。コントロールは生理食塩水を注射したラットから採取し、磁気ビーズを用いて純化したCD11b/c陽性細胞を使用した。

B4. DNA マイクロアレイによる遺伝子プロファイルの解析

上記のように抽出したRNAをからLow Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies)を用いcDNAの合成とcRNAのラベルと増幅をおこなった。ラベルしたcRNAをマイクロアレイ (whole rat, 44,000 gene, Agilent Technologies) にアプライし、ハイブリダイゼーションをおこなった。マイクロアレイの洗浄と乾燥後、Agilent Technologies Microarray Scannerを用いてスキャンした。得られた数値化データはグローバルノーマライゼーションによってアレイ間の補正をおこなった。生理食塩水 i.v.後とリポソーム i.v.後の結果を比較し、前者と比較して2倍以上発現量の差がみとめられた場合を有意と判定した。

B5. CFSE法によるCon A刺激に対するラット脾T細胞の増殖反応抑制の確認

B1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 $\times$ 105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比較し、コントロールと比較してあきらかに分裂回数抑制がみられるのを確認した。また、一部の実験は、CFSEを使用する変わりに、増殖の状態を位相差顕微鏡による目視でも確認した。

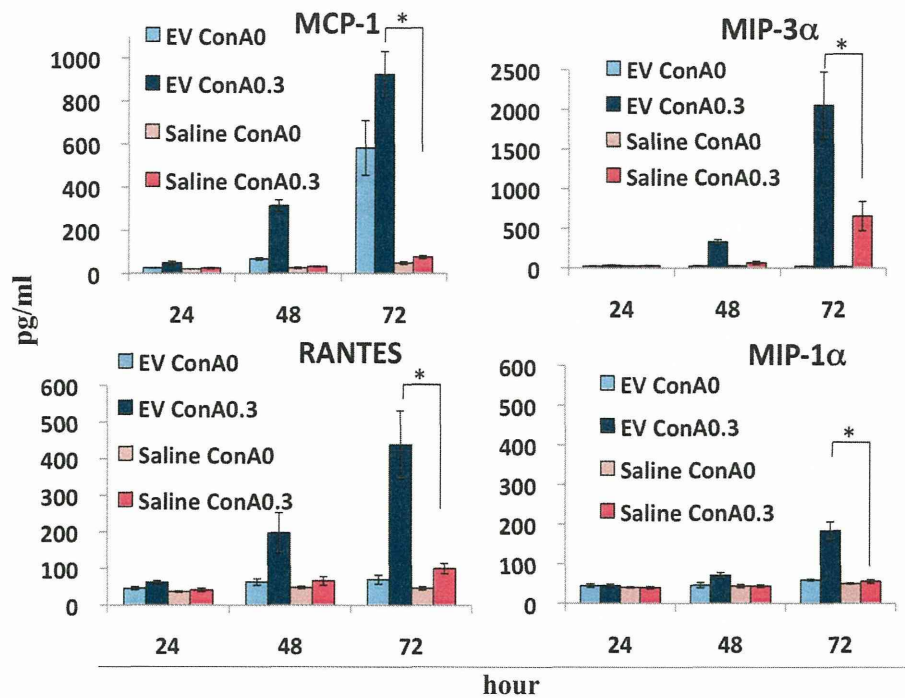


Fig 1. Production of Chemokines
Splenocytes were cultured in the presence of Con A (0.3μg/ml). The chemokine shown here increased in concentration in the culture supernatant of empty vesicle-loaded splenocytes (EV). (* : P<0.05)

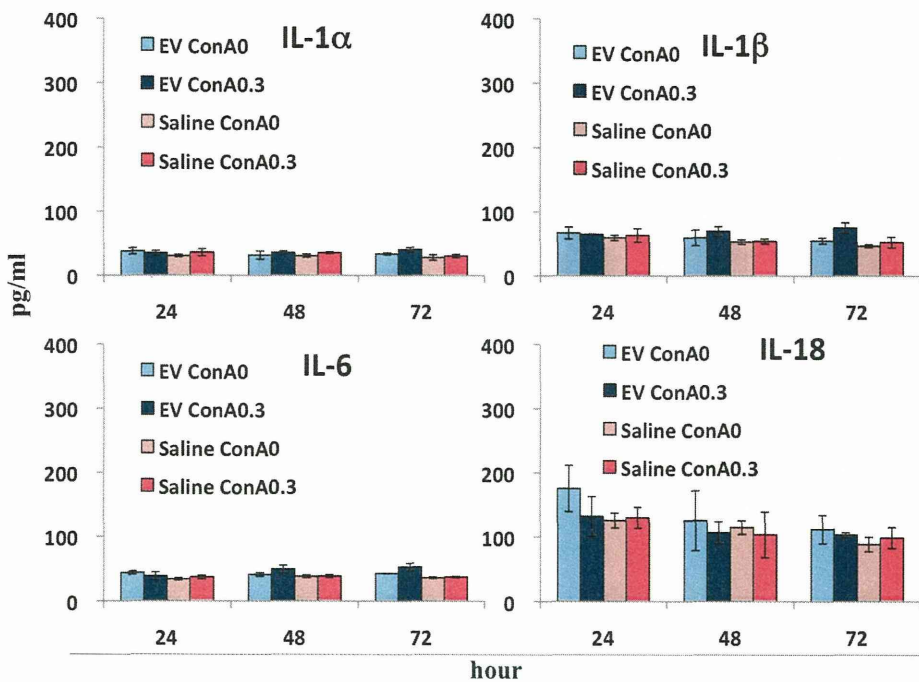


Fig 2. Production of cytokine
All the chemokine shown here did not change or increase in concentration in the culture supernatant.

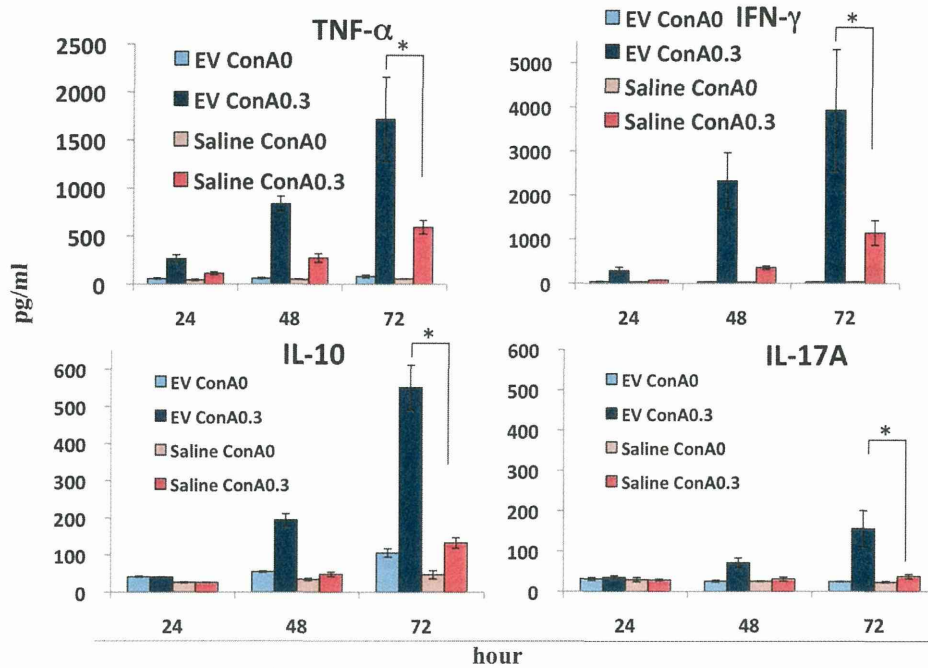


Fig 3. Production of cytokine

The cytokine shown here increased in concentration in the culture supernatant of empty vesicle-loaded splenocytes. (* : $P < 0.05$)

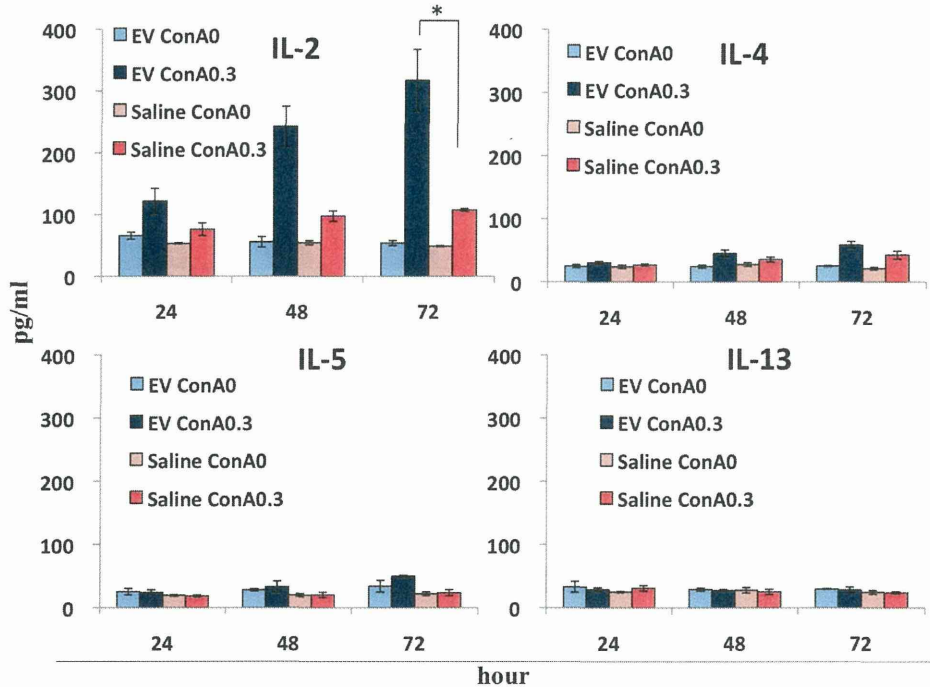


Fig 4. Production of Cytokine

Among these four chemokines, only IL2 increased in concentration in the culture supernatant of empty vesicle-loaded splenocytes than in saline-loaded splenocytes. IL4, 5 and 13 were shown not to be increased at all. (* : $P < 0.05$)

C. 研究結果

C.1 培養上清中に分泌されるケモカイン・サイトカインの動態

サイトカイン・ケモカインの濃度を経時的に測定した1回目の実験から、あらかじめリポソームを投与した脾細胞からの分泌が、生理食塩水のみを投与した脾細胞からの分泌を上回るものと、経時変化を認めないものに分かれた。主としてマクロファージから産生されるケモカインである、MCP-1, MIP-1 α , RANTESそしてMIP-3 α は、コントロール(生理食塩水投与脾細胞)と比較して、リポソームを投与した脾細胞ではConA刺激後72時間まで経時的に産生されていることがわかった(72時間の時点でP<0.05) (Fig. 1)。同じく、主としてマクロファージから産生されると考えられるIL-1 α , IL- β , IL-6, IL-18も、経時変化を認めなかった (Fig. 2)。同様の傾向は、TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-2においても認められた (Fig. 3, 4)。一方、IL-2, IL-17Aと同じく、T細胞由来のIL-4, IL-5, IL-13は、経時的な変化を認めなかった (Fig. 4)。一回目の実験の経時変化を踏まえ、実験2、3では、培養開始後72時間の培養上清中のサイトカイン・ケモカイン濃度のみを測定した。その結果、実験1の培養72時間と同様の結果を得た。

C.2 遺伝子プロファイルの解析結果

リポソーム貪食後の遺伝子発現量をコントロールと比較した結果、2回の実験で2回ともFold increaseが2.6以上であったものが168遺伝子あった。その中から、特にFold increaseが高く、かつ免疫応答に関係すると推定される数個の遺伝子についての結果を表にした (表1)。

D. 考察

D.1 リポソーム投与のサイトカイン・ケモカイン産生動態への影響

リポソーム投与後の脾細胞をCon A で刺激すると、T細胞の増殖が抑制されるが、T細胞の活性化

表1. 遺伝子プロファイルの解析結果

	Exp. 1	Exp. 2
Mmp14	57.2	51.3
Ccl9	37.4	46.43
ApoE	16.8	9.8
IL18bp	11.39	13.1
IL1a	5.6	9.9
CD276	5.27	7.21

は認められることを報告している。今回は、その時のケモカイン・サイトカインの産生動態を明らかにした。リポソーム投与によりCCケモカインの産生は一様に亢進していると思われる (Fig.1)。これらのケモカインが主としてマクロファージから産生される。従って、リポソームを貪食したことによるマクロファージの機能変化を反映していると考えられる。この事は、同じく主としてマロファージから産生されるとされるTNF- α やIL-10の産生も経時的に増加していることと矛盾しないと思われる。IFN- γ は、T細胞からの分泌が主と考えられているが、一部の樹状細胞はIFN- γ を産生するpotentialを持つことが知られており、観察されたIFN- γ の産生増強もリポソームを貪食したマクロファージからのものである可能性がある。この事は今後の検討が必要である。

一方、IL-1 α , IL-1- β , IL6, IL-18はいずれも主としてマクロファージから産生される。特にIL-1 α , IL-1 β は、同じくマクロファージから産生されるCC chemokineと異なり、分泌の亢進は観察されなかった。これは、産生経路が異なることが原因であると思われる。また、IL- β は自然免疫系の活性化の指標とされているが、少なくともこの実験系では、自然免疫系の活性化は、リポソームの投与の有無に関わらず、起こっていないと判断される。今後は、自然免疫系を直接刺激する事により、リポソームの自然免疫系の反応に与える影響を検討する必要があるだろう。

T細胞由来のサイトカインIL-2, IL-17Aはリポソ

ーム投与で産生が増強されるように見える。しかしながら、IL2はT細胞の増殖に必須であることから、リポソーム投与により、T細胞の増殖に抑制のかかった状態では、その消費が抑制されており、その結果コントロールと大きな差となって観察されている可能性がある。その一方でIL-4,-5,-13などのTH2サイトカインの分泌亢進は観察されなかった (Fig 2, 3)。これらの結果は、リポソーム投与により、少なくともIL2産生の抑制はなく、かつTh2サイトカインの産生増強もないと想定される。

D. 2 リポソーム食食後の遺伝子発現プロファイルについて

ApoEメッセージの増加は、食食したリポソームの構成成分である脂質を代謝する為には、必須の反応であると考えられる。ApoEメッセージの増強が観察されたことから、回収した細胞群が、目的の細胞を十分に含んでいたことを示しているものと考えられる。Mmp14とCcl9はいずれの実験でも非常に強い発現の増強を認めたが、その意義については不明である。CCL9は主にマクロファージから産生され、その受容体がCCR1である。実験結果から、リポソーム食食細胞が、CCR9を産生し、CCR1を発現している細胞を集積する作用を発揮する事が推測できる。

IL-1 α は主としてマクロファージから産生されるものであり、リポソーム投与後のDR-, CD11b/c+細胞群で遺伝子発現の増強を認めていることが示されたが、IL-1 β のメッセージの増強は認めなかった。IL-18bpもマクロファージから産生され、IL18と結合することにより、IL18のIFN- γ の産生増強効果を減弱する作用を有する。この事が、T細胞増殖抑制にどのように関与しているのかは、不明である。いずれにしても、CCL9, IL-1 α , IL-18bpはマクロファージの産生する物質であり、我々の実験系におけるimmuno suppressive macrophageを特徴的づける遺伝子発現パターンを示しているものと思われる。

CD276は、B7-H3分子と同じものであり、免疫応答の制御に関わる分子である。その機能に関しては、T細胞機能を促進するという報告と抑制するという報告の相反する2つの報告がある。我々の系においては、B7-H3がT細胞の増殖を抑制する事に関与している可能性があるので、今後B7-H3の役割について、検討を進めて行きたいと考えている。

E. 結論

ラットに空リポソーム溶液を循環血液量の20% (v/v)相当の量を投与した後に、脾臓を取り出し、Con A刺激を加えて培養し、サイトカイン・ケモカインの産生動態の変化を網羅的に観察した。ケモカイン・一部のT細胞由来サイトカイン、IL10, TNF- α , IFN- γ の産生亢進が観察された。特に、主としてマクロファージ由来と考えられるケモカインの産生増強は、リポソームのマクロファージへの一過性の影響の一端を反映しているものと思われる。得られた結果は、リポソーム食食マクロファージが、食食後もその機能を保持していることも示している。また、リポソーム食食マクロファージに特有な遺伝子プロファイルが示され、その中から、T細胞増殖抑制作用に関与する候補遺伝子と考えられるものが同定された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

(原著論文)

1. M. Fujihara, D. Takahashi, H. Abe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, H. Ikeda, H. Azuma. Primary and secondary immune responses to keyhole limpet hemocyanin in rats after the infusion of hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier. *Artif. Organs* 38, 234-238 (March, 2014)

(総説)

1. 酒井宏水, 堀之内宏久, 東 寛, 小田切優樹, 小林紘一. 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の安全性試験. 人工血液 21, 36-48 (2013)

(著書)

1. H. Azuma, M. Fujihara, H. Sakai. Biocompatibility of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, on blood cells and plasma proteins in vitro and in vivo. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 22, pp.385-397, 2013.

(学会発表)

1. H. Sakai, H. Horinouchi, H. Azuma, M. Otagiri, K. Kobayashi / Artificial red cells (Hb-vesicles) for blood substitutes and oxygen therapeutics /14th International Symposium on Blood Substitutes and

Oxygen Therapeutics / Chengdu, China / Oct. 18-21, 2013

2. 東 寛 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)を構成する脂質2重膜のもつ免疫調節効果について / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013年12月6-7日
3. 東 寛, 高橋弘典, 永井 一樹, 長森恒久, 高橋大輔, 藤原満博, 酒井宏水 / リポソームの投与後の脾細胞からCon A 刺激により産生されるサイトカイン・ケモカイン動態の網羅的解析 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013年12月6-7日

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(ヘモグロビン小胞体)製剤の実用化を目指す研究

分担課題：ヘモグロビン小胞体(HbV)の出血性ショックにおける有用性に関する研究

分担研究者 高瀬 凡平 防衛医科大学校 附属病院 集中治療部・准教授
(臨床教育教授)

研究協力者 木下 学 防衛医科大学校・准教授

研究要旨

出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生しいわゆる“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈するとされている。しかし、致死性不整脈の発生機序に関する検討は少ない。そこで、実験的に検討した。方法：SD rat (n=32) に30%出血性ショック状態を作成し、非蘇生群、洗浄赤血球 (RBC) 蘇生群、生理食塩水蘇生群、5%アルブミン蘇生群の4群間で心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na⁺ channel 感受性色素を用いたOptical mapping system (OMP)で興奮伝播・活動電位持続時間不均一性 (Action potential duration dispersion :APDd)、致死性不整脈性を検討した。また、心筋組織のconnexin 43 (Cx43)発現を免疫組織染色にて検討した。蘇生群では、3群とも全例蘇生に成功した。しかし、生理食塩水、5%アルブミン群ではOMPで著明な左心室伝導遅延とburst pacingによる心室細動が全例で誘発されたのに対し、RBC蘇生群では、伝導遅延・心室細動誘発ともに認められなかった。生理食塩水、5%アルブミン群では著明にAPDd値が増大したが、RBC群では正常に保たれていた。Cx43発現は生理食塩水、5%アルブミン群では異常が認められたものの、RBC群では正常に保たれていた。以上より、出血性ショック心臓では、左心室伝導遅延とAPDd増大及びCx43発現異常を惹起し、電氣的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。RBC治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。また、このモデルは、HbVの有効性を評価するのに適したものと考えられる。

A. 研究目的

これまでの多くの研究や臨床診療において心筋機能障害や心不全は遷延する出血性ショックに伴って頻繁に認められるとされている。これらは、出血性ショックからの一時的回復後の予後不良及び出血性ショック時の致死性血行動態破綻に関わる。先行研究によると出血性ショックに伴う心筋虚血や心筋低酸素状態が出血性ショック時の致死性心筋機能障害を惹起すると報告されている。出血性ショックの心臓への致命的障害を回避するために

は、出血性ショックの心臓への致命的障害を回避するためには、出血性ショックからの迅速な回復や心筋への重篤な虚血や低酸素血症を未然に防ぐ有効な治療が必要である。

また、出血性ショック・蘇生は、心筋全体の虚血・再還流である。さらに、平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生しいわゆる“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈するとも報告されている。しかし、“出血性ショック心臓”の蘇生後の致死性

不整脈出現やその病態に関する検討は少ない。そこで、実験的に30%出血性ショック状態を作成し、5%アルブミン、生理食塩水、洗浄赤血球で蘇生した3群で心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na⁺ channel 感受性色素を用いたOptical mapping systemで興奮伝播・活動電位持続時間不均一性及び致死性催不整脈誘発性を検討するとともに、心筋組織の心筋興奮伝導蛋白であるconnexin43発現を免疫組織染色し、非蘇生群を対照群として、出血性ショック心の不整脈発生機序を検討することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

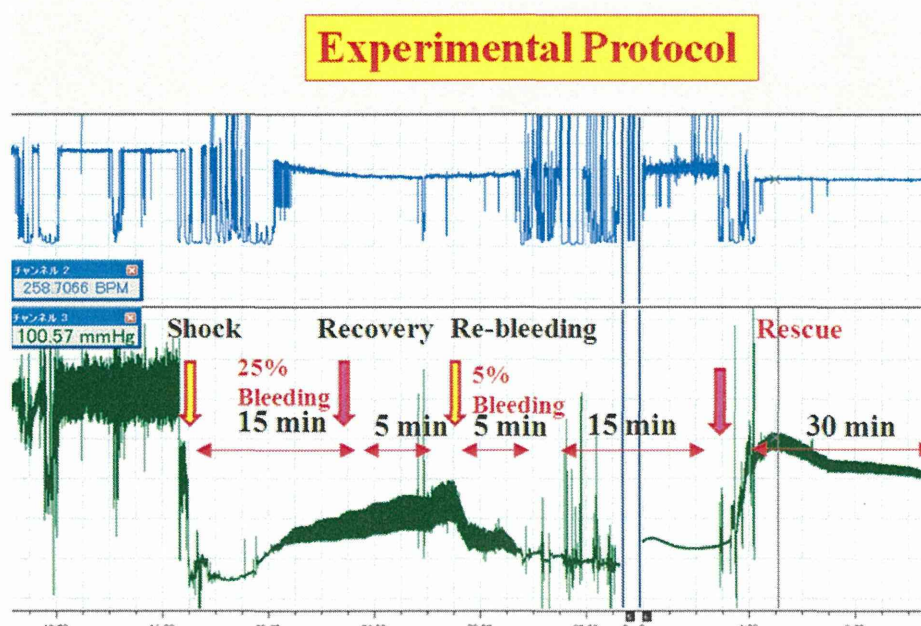
Sprague-Dawley rats (male; 8 weeks old; 250-300 g; n = 32)の皮下にketamine hydrochloride (5 mg/kg)を投与し麻酔した。麻酔下に気管内挿管し、人工呼吸下で、abdominal aorta catheter挿入、血圧測定するとともにabdominal aorta catheterから脱血し、以下のプロトコールで致死性出血性ショックモデルを作成した(図1)。すなわち、循環血液量25%を15分で脱血、5分間放置後再出血モデルとして、5%を5分かけて再脱血(Total 30% blood loss : 不可逆性 Shock)を実施した。その後15分間放置したのち、脱

血量と同量 ①5%アルブミン (5%アルブミン群)、②生理食塩水 (生理食塩水群) 及び③洗浄赤血球 (洗浄赤血球群) 蘇生した。また、④非蘇生群も対照群として作成した (各群、n=8)。

(1) Optical mapping analysis 法と不整脈誘発法

Ratsを麻酔後、正中切開にて開胸し、迅速に心臓を摘出した。大動脈から冠動脈洞にカニユーレを挿入した。酸素化し37度に保温したTyrode溶液 (CaCl₂ [2], NaCl [140], KCl [4.5], dextrose [10], MgCl₂ [1], and HEPES [10, pH 7.4], in mmol/L) にて直ちに灌流した。さらに、Tyrode溶液を一定容量で灌流している水槽に心臓を固定し、大動脈に挿入したカニユーレからNa感受性蛍色素 (di-4-ANEPPS [15 μmol/L]) を約40ml、2分間かけて灌流染色した。さらに、心臓の拍動を停止させるため2,3-butanedione monoxime (Wako Chemical, Tokyo, Japan, 20 mM) を灌流した。Optical mapping analysis はhigh-quality charge couple device (CCD) camera (Leica 10447050, Geneva, Switzerland) を用いて4秒間撮像した。撮像は心筋が洞調律であることを確認してから、左心室、右心室外膜面の興奮伝播時間(ms)と伝播様式、得られた活動電位持続時間

図1



(APD)をcommercialized software (Ultima-6006; Sei Media, Inc., Tokyo, Japan)にて解析した(図 2)殊に、右心室心膜面の約5x5mmの関心部位(ほぼ右心室自由壁の中央)を任意に設定し、この部位におけるAPDの分布のヒストグラムと、APDの実波形を

記録した。APDはAPD 60msを使用した。ヒストグラムより、最大APDと最小APDの差からAPD不均一性 (APD dispersion [ms]) を決定し、出血性ショック蘇生後摘出心臓における、経時的APD dispersion変化を比較した (図 3)。

図2 Optical Mapping (Activation Map)

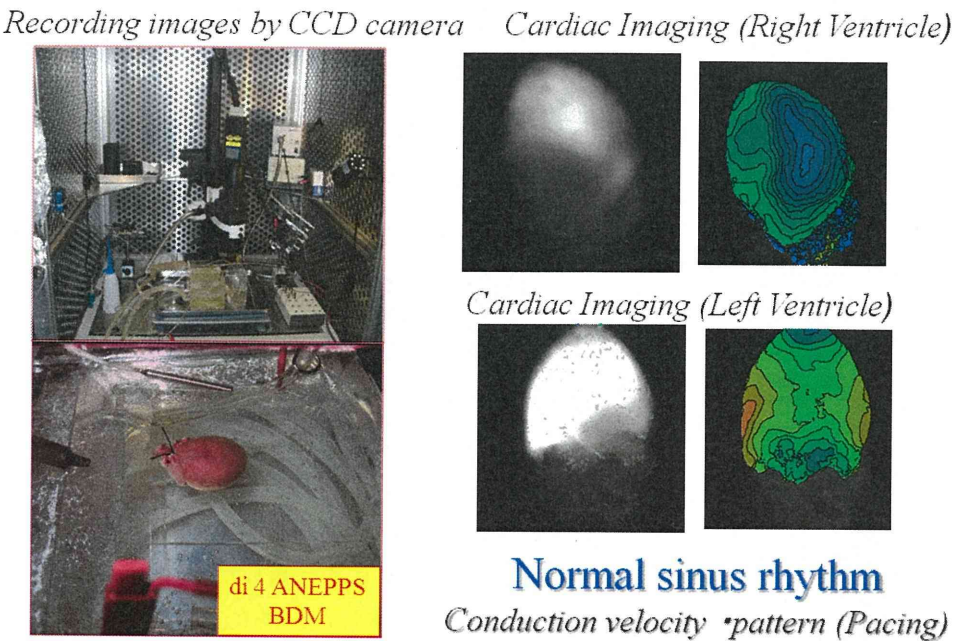


図3 Optical Mapping (Measures of Action Potential Duration Dispersion)

