

3.3 結果に影響する可能性のある因子(交絡要因)に対する配慮

(交絡要因情報の種類・収集法、予測される交絡要因の調整法、等)

本研究では安全性を脅かす要因が交絡要因となると考えられる。第1相試験のみであれば交絡要因を考慮する必要はないと考えられるが、第2相試験としてとらえた場合は、照射後の副作用としての放射線肺臓炎が予後に与える影響が挙げられるが、これらの要因が交絡要因となるかについては現在でははっきりせず、症例ごとに検討し、交絡の可能性が高いとわかった段階で、場合によっては新たに第2相試験を組みなおすことが必要である。

3.4 研究対象者

3.4.1 研究対象者となる可能性のある集団の全体対象となる症例は

- ◇ 進行悪性腫瘍症例
- ◇ 胸壁進展あるいは胸壁転移症例で、治療により疼痛制御や呼吸機能の改善が期待される患者
- ◇ 既治療に反応が乏しい症例
- ◇ 脳転移を認めない症例
- ◇ PS 0~2の症例
- ◇ 腎機能、肝機能が正常かもしくは正常に近いと考えられる症例
- ◇ 予後が3カ月以上あると予想される症例

3.4.2 取込(採用)基準(比較群についても記載)

- 腫瘍の胸壁進展に関しては初回治療であること
- 現疾患の治療にはどのような治療が行われていてもよいが、登録時点で、有効な治療法がなく、進行性であることが明らかな症例。

3.4.3 除外基準(比較群についても記載)

- 脳転移例
- 状態が悪く予後3カ月未満と考えられる症例
- xx病院で治療が不可能な症例

3.4.4 サンプル数およびその算出根拠

癌治療に対する第1相(安全性試験)、第2相試験(容量決定試験)なので、多くの症例数はいらないと考えられる。

低用量群(動注30ml+照射) 3人
中等用量群(動注60ml+照射) 3人
高用量群(動注100ml+照射) 3人
でよいと思われる。

3.4.5 (介入研究)対象者に対する介入打ち切り基準(副作用、心身状態の悪化・変化等で介入を中断する場合の基準)

アナフィラキシーショック、血液学的検査で正常範囲から大きく変化が起こった場合。
本人の希望が挙げられるが、研究の実施は1回で終了するため、実質的にはアナフィラキシー以外は研究途中で打ち切りというわけにはいかない。

3.4.6 (介入研究)コンプライアンスの確認方法 治療(介入)は医師立会のもとに行われるので、治療後の経過観察上のコンプライアンスに関して患者とよく連絡を取って行う。

3.5 追跡・打ち切り

追跡はxx大学病院外科外来を基軸に医師が定期的に行う。

副作用や、本人の希望で研究が中断した場合は打ち切りとし、死亡により研究から外れた場合は非打ち切りとする。

3.5.1 研究期間

20xx年xx月～20xx年xx月まで x年間

3.5.2 (介入研究、前向き観察研究) 追跡不能例に対する対処

打ち切り症例として処理する

3.6 (介入研究) 研究の中止

病勢の進行で治療の継続が困難な場合
本人の希望がある場合

36.1 研究の中止基準

重大な副作用 (アナフィラキシーショック、死亡など) が明らかとなった場合。

3.6.2 中止基準の確定法

臨床症状において評価、

N. 「説明と同意文書」 (案)

.....
-Hb小胞体を用いた治療抵抗性の悪性胸壁腫瘍に対する放射線照射による抗腫瘍効果の増強-

患者PNO

患者氏名 ○○○○

治療年月日 YY/MM/DD

はじめに

肺がんは根治が難しく、再発の多い腫瘍です。初発の肺癌に対する治療法の開発は最優先で進められていますが、再発に対する治療は効果のある治療法が確立しているとは言えません。とくに疼痛や機能異常などの症状がある場合には再発の治療が効果がないと症状を取るだけの姑息的な治療が主体となります。症状を有する再発症例の治療法を開発してゆくことは肺癌の予後を改善するだけでなく、普通の生活をしながら治療を続けるうえでも重要なことです。

本研究の目的

現在の〇〇様の病状は胸壁に腫瘍が再発し周囲に浸潤しているため、疼痛がある状況です。

本研究ではこのような胸壁の有痛性の腫瘍に対して抗腫瘍効果を有する放射線照射を主体として行い、放射線の感受性を増強するために人工酸素運搬体を動脈より注入したうえで照射を行い、腫瘍の縮小を図り、疼痛を治療しようとするものです。

本研究の根拠

肺癌を含め、固形腫瘍は自律性に大きくなるにもかかわらず、腫瘍を栄養する血管系は正常な成長速度でしか増殖しないため、血流が乏しくなり、低酸素環境に置かれています。

低酸素環境に置かれた腫瘍に対しては抗がん剤や放射線照射の効果が減弱することが判明しており、腫瘍の酸素環境を改善することで治療の反応性がよくなると考えられています。

現在までいろいろな方法で腫瘍の低酸素環境を改善しようとする試みが行われてきましたが、長時間にわたって酸素環境を改善することが困難でした。

われわれは、このような腫瘍を治療するに当たり、腫瘍の酸素環境を改善するために人工酸素運搬体 (人工赤血球) を用いる方法を研究してきました。人工赤血球は血漿相に分散して血流中を流れるため、通常の血液が運ぶ以上の酸素を組織へ運搬することができます。動物モデルを用いて検討したところ、腫瘍部分の酸素分圧を倍以上増加させることができることがわかりました。この酸素環境が改善した時間を狙って放射線照射を行うと、腫瘍は小さくなり、生存期間も延長することがわかりました。

人工酸素運搬体の種類を変えても同様の結果を得ることが可能でした。

現在われわれが開発している人工酸素運搬体は

ヘモグロビン小胞体といって、期限切れの輸血用血液より酸素運搬を行うヘモグロビンというたんぱく質を抽出精製して、リポソームで被覆し、250ナノメートルの粒子にしたものです。動物実験では血液量の50%を入れ替えても安全であるとの結果を得ています。

本研究ではこのヘモグロビン小胞体を腫瘍を支配する動脈より注入して腫瘍の酸素環境を改善し、放射線照射を行うことで胸壁の腫瘍を縮小させ、症状を改善することを目的としています。

本研究に参加できる患者さんの条件は以下のようになります。

対象となる症例は

- ◇ 進行悪性腫瘍症例
- ◇ 胸壁進展あるいは胸壁転移症例で、治療により疼痛制御や呼吸機能の改善が期待される患者
- ◇ 既治療に反応が乏しい症例
- ◇ 脳転移を認めない症例
- ◇ PS 0～2の症例
- ◇ 腎機能、肝機能が正常かもしくは正常に近いと考えられる症例
- ◇ 予後が3カ月以上あると予想される症例

取込（採用）基準

- 腫瘍の胸壁進展に関しては初回治療であること
- 現疾患の治療にはどのような治療が行われていてもよいが、登録時点で、有効な治療法がなく、進行性である症例。

除外基準

- 脳転移例
- 状態が悪く予後3カ月未満と考えられる症例
- xx病院で治療が不可能な症例

本試験にご参加いただけない場合でも通常に行われる治療を選択することが可能ですし、不参加による不利益は生じません。

本試験にご参加いただける場合は治療が順調に進んでいる以内にかかわらず、途中で本治療法以外の治療法を選択することも可能ですが、その際は主治医に申告してください。

説明年月日 YY/MM/DD

説明責任者 ◎◎◎◎

説明を受けた人 △△△△

患者氏名 ○○○○

患者家族 □□□□

医師主導の臨床研究同意書

わたくしは「Hb小胞体を用いた治療抵抗性の悪性胸壁腫瘍に対する放射線照射による抗腫瘍効果の増強」の臨床研究に関して十分な説明を聞き、研究の参加を承諾いたしましたので、ここに署名いたします。なお、本研究に伴う合併症が起きた時には研究を中止するとともに可能の範囲内で治療が受けられるよう対処していただけることも了承いたします。

承諾年月日 YY/MM/DD

患者ID

患者氏名

患者家族氏名

（続柄）

.....

1.2.(独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)の事前面談について

(1回目面談)

A. 緒言

厚労科研補助金 創薬基盤推進研究事業(創薬総合推進研究事業) 課題「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(研究代表者: 酒井宏水)」を推進している。プログラムオフィサー(PO)および厚労省よりPMDAの薬事戦略相談を積極的に活用することを勧められ、今回の申込に至った。

B. 方法

(実施年月日)

2012年12月7日 11:00—12:00

(PMDA側担当者名(敬称略))

高見廣行、宇山佳明、増田広之、吉田理人、紀平哲也、仲井友子、谷之口貴光、阿部喜穂

(本研究班側出席者)

酒井宏水 (早稲田大学)

(質問事項)

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の検査法、安全性試験について

a) 原料ヘモグロビンは、期限切れの非使用赤血球から精製単離している。精製工程にはウイルス不活化工程(加熱処理 60°C, 12hr)、ウイルス除去工程(ナノフィルトレーション処理)が含まれる。これらの工程の妥当性を示すための基準は何か(対象ウイルス、必要とされるLog reduction factorなど)。

b) 本製剤の滅菌法について。微粒子(250nm)のため、フィルタ濾過滅菌法が採用できない。β-プロピオラクトン(BPL)を使う薬液滅菌法の妥当性について。

て。

c) 無菌試験法について、日本薬局方記載の「メンブランフィルタ法」は、フィルタ目詰まりのため採用できない。また、人工赤血球製剤が赤色の分散液のため濁度が高く、日本薬局方記載の「直接法」では判定できない。そこで「直接法」に改良を加え、1回目の培地を2回目の培地に植継ぐことで濁度を低減させて、無菌性を判定することにしたい。この考えの妥当性について。

d) 人工赤血球製剤は、4種類の脂質(リン脂質、コレステロール、合成脂質、PEG結合リン脂質)、ヒト由来ヘモグロビン、ピリドキサル-リン酸から構成される分子集合体(ヘモグロビン小胞体)微粒子が生理食塩水に高濃度に分散した液性製剤である。分子集合体として初めて酸素運搬機能を発揮する安全性の高い微粒子となるので、構成成分それぞれについて単独で安全性評価することは難しい(界面活性の高い脂質、コレステロール、本来赤血球内にあるヘモグロビンなど、単独での投与評価は無意味である)。この考え方について御意見をお聞きしたい。

e) Non-GL製剤について、既に多くの安全性試験を実施してきた(齧歯類、犬、ブタ、サル投与試験、ヒト末梢血混合試験など)。従来に無い新しい製剤(人工赤血球製剤)の安全性試験として、先見的に実施すべき項目として他に何が残されているか(POからの指摘)。

C. 相談概要

対面助言を実施するための資料作成にあたり、上記項目について次の助言を受けた。

a) ウィルス安全性評価については、医薬審第329号「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウィルス安全性評価」、

医薬発第1047号「血漿分画製剤のウィルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて」に従って実施するように助言を受けた。また、実際の製造工程と同等性が担保された小型スケールでウィルスクリアランス試験が必要であることを受けた。

b) BPLを使う薬液滅菌について、選択した理由と、残存物についての記載が必要となろうとの指摘を受けた。

c) 人工赤血球の無菌試験法について、選択した理由と、実験結果の詳細についての提示が必要になろうとの指摘を受けた。

d) 人工赤血球の構成成分それぞれについて単独で安全性評価することが困難であることについて、“合成脂質:DHSG”については検討の余地があるかもしれない。従来リポソーム製剤において、薬効を示す成分を除いた空のリポソーム単独についての安全性を検討した例があるので、人工赤血球の場合も、ヘモグロビンを省いたリポソームの安全性試験を実施する必要はあるかもしれない、との意見を得た。

e) 必要となる安全性試験項目については、医食審査発0323第1号「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に従って実施するように助言を受けた。記載されている安全項目のうち不要と思われる点については、何故それが不要なのか、或は不可能なのか、理由を明確にすることとの助言を受けた。また、最終的に人工赤血球の適応疾患を何とするか、それによって安全性試験項目が変化する可能性があるであろうとの助言を受けた。(これについては、投与量が最も多いことが予想される輸血代替を目標として考えていく予定。)

その他、つい最近発令された薬食血発1127号第1号

「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく公募について」の通知を受けた。今後、ヘモグロビンの原料となる非使用血液が必要な場合には、日本赤十字社に申請する旨、理解した。

(2回目面談)

A. 緒言

厚労科研補助金 創薬基盤推進研究事業(創薬総合推進研究事業) 課題「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」は、平成26年度が最終年度である。当初は実施企業への技術移転により実用化を促進することを見込んでいたが、実施企業を見出すことが出来なかった。しかし、来年度以降も公的資金を受けて、非臨床試験(GLP)を経て医師主導の臨床研究を進める計画を検討することにしたので、これまでの成果と課題について、明らかにし、また当方の方針が妥当かどうかを検討するため、PMDAの事前面談を受けた。

B. 方法

日時：2015年1月13日 15:00 – 15:45

面談者：酒井 宏水(奈良県立医科大学 教授)

PMDA側担当者名(敬称略): (大阪) 川村郁夫、平田雅一、内藤彩矢子、秋田晶平、(東京) 高見廣行、谷之口貴光、仲井友子、ほか

C. 結果

厚労科研補助金 創薬基盤推進研究事業(創薬総合推進研究事業) 課題「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(研究代表者：酒井宏水)」を推進している。来年度以降も公的資金を受けて、非臨床試験(GLP)を経て医師主導の臨床研究を進める計画を検討しているが、次の項目について御助言を頂きたい。

1) 本製剤の滅菌法について。人工赤血球は微粒子(250nm)のため、フィルタ濾過滅菌法が採用できな

い。ガンマ線は製剤を変性させる。β-プロピオラクトン(BPL)を使う薬液滅菌法を検討したが、芽胞に対しては不完全であり、またヘモグロビンの変性が判明した。そこで、無菌化した原薬の導入から最終製剤まで完全な無菌雰囲気にて製造することにより製剤の無菌化を達成する方針に切り替えて製造している。そして規定の無菌試験法により最終製品が無菌であることを確認している。本製剤は懸濁した液体なので、規定に従い、培地を新しい培地に植継ぐ方法により無菌であることを確認している。本製剤を用いて医師主導の臨床研究(first in human)を目指すことに、どのような課題があるか。またその先の開発段階でどのような課題があるか。

現在はシンガポールの検査受託会社に委託して実施しているため、米国の薬局方(USP)に従って実施している。提出した試験データについて事前面談では質問に答えることはできない。今後は日本薬局方に記載の方法を確認して対面助言に臨むべき。

2) 人工赤血球の成分はヒト由来ヘモグロビンであるが、NAT検査済みの献血液で使用期限が過ぎたものやALT検査落ちを用いているので、ウィルスは実質上無い。安全性を高めるため、精製工程に加熱処理(60°C, 12時間)とナノフィルトレーションを採用している。2007年にCharles River社に検査委託をして、バリデーションのデータが得られている。今後公的資金を受けて医師主導の臨床研究までを想定した場合に、ウィルス否定試験により最終製品にウィルスが無いことを確認すれば良いか。ウィルス不活化・除去工程のバリデーションはこの段階でも必要か。

医師主導臨床試験も企業主導の臨床試験も、GCPで実施されるものであり、製剤に求められる安全性は全く同じである。溯及調査が必要であり、供給元である日赤と安全情報について連携をとって

進めるべき。またナノフィルトレーションの材質や孔径については日進月歩で変化しており、方法が変わればバリデーションも再度必要になる場合もありうる(提示したデータについては事前面談ではコメントできず)。考慮すべきガイドラインについて、i) 血漿分画製剤のウィルスに対する安全性確保に関するガイドライン、ii) 生物由来原料基準、iii) ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウィルス安全性評価について、iv) ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について、v) 献血血液の研究開発等での使用に関する指針、vi) バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価、vii) 医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床試験安全性試験の実施についてのガイダンス、などがあり資料を頂く。

3) 人工赤血球が臓器保存液としても有効であることが解って来た。市販の臓器保存液は医薬品には該当しないと聞かすが、人工赤血球も、この場合は医薬品には該当しないと考えて良いか。

本件については、厚生労働省 医薬食品局 監視指導・麻薬指導対策課に相談すべきである。

4) その他

反復投与毒性試験については、全ての薬剤について必須のものでは無い。臨床において単回投与を前提としているものであれば、反復投与毒性試験は必要が無い可能性、或は投与期間が短くなる可能性もある。従って、臨床における適用を想定した毒性試験プロトコルの決定が必要となる。不必要な動物試験は極力避けるべきとの意見を頂いた。

事前面談では質問に対して十分な回答は出来ないため、対面助言に進むべき。

1.3. カニクイザルにおける体内動態評価

A. 諸言

HbVの臨床試験への移行を想定した場合、齧歯類や中型動物における前臨床評価に加え、ヒトと同じ霊長類であるサルを用いた評価も重要であると考えられる。その主な理由として、霊長類における安全性試験結果は、ヒトに投与後の安全性の予測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作成の重要な基盤情報になる、ことが挙げられる。そこで、雄性カニクイザルにHbVを1400 mg Hb/kgで単回投与し、HbV投与14日後までの血中滞留性について検討した。さらに、アロメトリック式を用い、カニクイザルの体内動態結果に加え、これまでに報告されているマウス、ラット、ウサギの体内動態結果から、HbVのヒトにおける半減期を予測した。

B. 方法

1. 動物

実験動物はカニクイザル（オス、4～8才、5.57～5.93 kg）を用いた。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。12時間の明暗サイクルで飼育し、固形飼料を約108 g/day及びトリーツを2回/週で与え、水は自動給水装置を用い自由摂取させた。

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、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. HbVの投与

カニクイザルを保定器に拘束し、ディスプレイブルー注射筒、留置針、延長チューブ及びインフュージョンポンプを用い、無麻酔下で前腕橈側皮静

脈に1400 mg Hb/kgの投与量でHbV溶液（遺伝子組み換え型ヒト血清アルブミンを5%含有）を1 mL/minで投与した。

4. 体内動態

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ヘパリンナトリウム加注射筒を用い採血した。直ちに遠心処理を行い、血漿を得た。

得られた血漿中のヘモグロビン濃度をシアンメトヘモグロビン法（ヘモグロビンBテストワコー）により測定し、血中濃度推移を評価した。

5. ヒトへの外挿

動物実験における体内動態結果を経験的にヒトまで外挿する方法の一つであるアロメトリック式を用い、ヒト（70 kg）におけるHbVの半減期を算出した。アロメトリック式はクリアランスが体重のべき乗に比例するという経験則に基づいており、以下の式で表される。

$$P = \alpha \cdot W^\beta$$

P: 分布容積 (Vdss) またはクリアランス (CL)

W: 体重 (kg)

α : アロメトリック係数

β : アロメトリック指数

マウス・ラット・ウサギの体内動態結果は以下の論文の値を用いた。

J Control Release. (2009) 136:232-9.

J Pharmacol Exp Ther. (2005) 312:702-9.

C. 結果および考察

1. 体内動態評価

HbVを含む血液を遠心分離処理するとHbVは血漿分画に残存するため、HbVと赤血球の分離は容易に行うことが可能である。そこで、HbVの血中動態を検討するために血漿中ヘモグロビン濃度をシア

ノメトヘモグロビン法で測定することで、HbVの血中動態を評価した。その結果、すべてのカニクイザルにおいて投与終了後12時間までは一定の血中濃度を示し、細網内皮系細胞の飽和に起因すると考えられる一過性の消失の飽和現象が確認された (Fig. 1, inset)。しかしながら、投与終了12時間以降では、1-コンパートメントで消失し、消失層での半減期は約60時間と算出された (Fig. 1)。

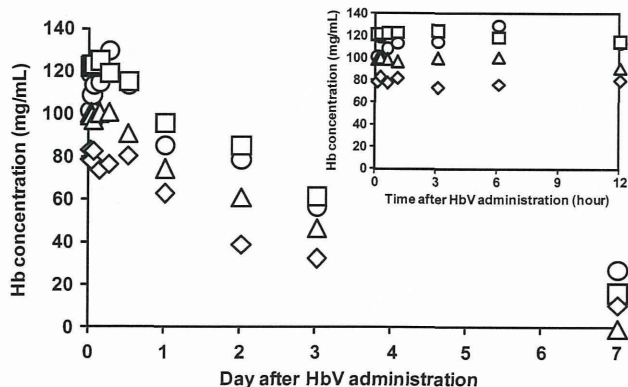


Figure 1
Time course for plasma concentration of hemoglobin represents HbV concentration in plasma after HbV administration at a dose of 1400 mg Hb/kg in cynomolgus monkeys. The individual values are representing as following symbols (○; No.1, □; No.2, △; No.3, ◇; No.4).

また、投与後14日目には、血漿中HbVはシアンメトヘモグロビン法で検出できず、目視上においても血漿中にHbVは確認されなかったことから、投与後14日目までには、HbV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 (Fig. 2)。これらの結果より、HbVは霊長類 (カニクイザル) においても十分な血中滞留性を有し、また、1400 mg Hb/kgと大量単回投与しても投与後14日目には血中より完全に消失していると考えられ、血中蓄積性はないことが確認された。

2. アニマルスケールアップ

HbVのヒトにおける体内動態の予測はHbVのヒトにおける安全性、有効性を予測する上で有用で

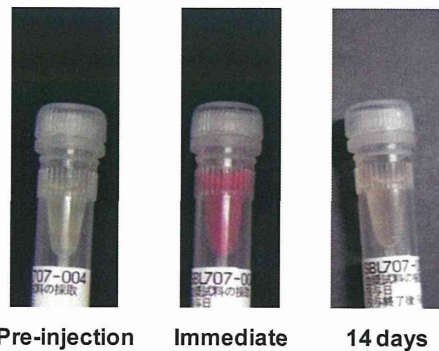


Figure 2
The appearance of plasma before HbV administration (left), immediately after finishing administration (middle) and 14 days after HbV administration (right).

あると考えられる。そこで、数種類の動物における体内動態実験結果を経験的にヒトまで外挿する方法であるアロメトリック式を用い、HbVのヒトでの半減期の算出を行った。常法に従い、マウス、ラット、ウサギ、カニクイザルの結果よりヒト (70 kg) における分布容積 (Fig. 3A)、クリアランス (Fig. 3B) を予測した。Fig. 3A, Bで算出した分布容積、クリアランスよりHbVの消失相の半減期を算出したところ、約160時間と予測され、ヒトにおけるHbVの消失半減期は約5~6日程度であると予測された。

D. 結論

カニクイザルに対し、HbVを1400 mg Hb/kgで単回大量投与した場合、HbVの霊長類での血中動態特性は齧歯類では見られなかった消失の飽和現象が投与後12時間まで認められた。これは、カニクイザルへの投与時間が齧歯類と比べ、非常に長かったため、投与中にHbVの消失経路である細網内皮細胞が飽和したためと考えられる。しかしながら、投与後12時間以降より消失が始まり、投与14日後には血中より消失し、血中蓄積性はなかった。

以上より、HbVを霊長類へ投与した今回のケースでは、HbVは霊長類においても十分な血中滞留性を保持していると考えられるとともに、生体蓄積性

はないと推察された。

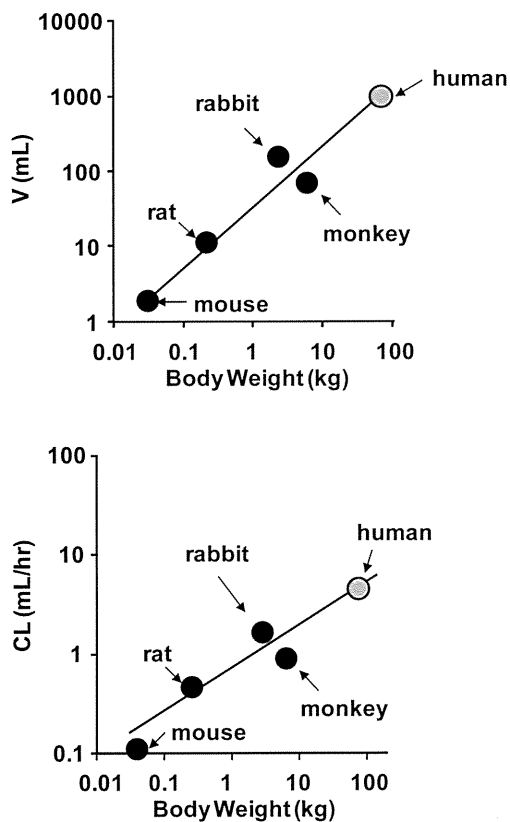


Figure 3
Allometric relationships between body weight and distribution volume (V) and body weight and clearance (CL).

The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method.

E. 健康危険情報

該当なし

1 4. 高脂血症モデルマウスにおける人工赤血球の安全性及び体内動態評価

A. 研究目的

これまでに、HbVは健常動物のみならず、出血性ショックモデルや肝硬変モデルなどの様々な臨床疾患モデル動物においてその安全性が明らかとされている。しかしながら、現代の生活習慣病患者及びその予備群の増加を鑑みると、生活習慣病疾

そこで本研究では、脂質代謝に異常をきたしている疾患として生活習慣病の1種である高脂血症を選択し、本モデルとして汎用されているApoE欠損マウスを用いHbVの生化学的評価、組織学的評価及び体内動態評価を行った。

B. 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. 動物

ApoE欠損マウス (B6. KOR/StmSlc-Apoe^{shl}、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。

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、生理食塩水 (20 mL/kg) または HbV 2000 mg Hb/kg (20 mL/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 日目に体重測定を行った後に、血液・臓器 (腎臓、肝臓、脾臓、心臓、肺) を回収した。

4. 血球パラメータの測定

血球計数装置 (Celltac α ; MEK-6458, 日本光電) により血球パラメータを測定した。

5. 血漿パラメータの測定・分析

得られた血液を 3000 rpm で 10 分間遠心分離し、血漿を採取した。さらに、得られた血漿を 50,000 g で 20 分間超遠心分離することにより、血漿中に含まれる HbV を除去し、上清を回収し、測定まで -80 °C で保存した。血漿パラメータの測定は株式会社 SRL に委託した。

6. H.E.染色 (Hematoxylin-Eosin stain)

摘出した臓器を 4 % パラホルムアルデヒドに浸し (4°C, overnight)、パラフィン固定した。その後、厚さ 5 μm 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。切片の脱パラフィンを行った後、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、その後、流水水洗し、脱水、透徹、封入を行い、組織像を蛍光顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス) で観察した。

7. 体内動態評価

7-1. 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。

7-2. 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 (20 mL/kg) を尾静脈より投与した。投与後 1・3・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。

7-3. 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・3・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。

C. 結果および考察

1. 一般状態

HbV投与後、すべてのApoE欠損マウスにおいて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。

2. 体重及び臓器重量変化

まず、生理食塩水またはHbV (2000 mg Hb/kg) を ApoE欠損マウスに投与し、投与14日後までの体重変化をFig. 4に示す。その結果、両投与群の間で体重変化に差は見られなかった。

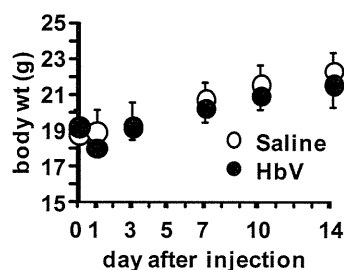


Figure 4

Change in body weight after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6. KOR/StmSlc-Apoe^{sh1} mice.

The values are mean ± SD. (n=5)

次に、HbV投与1・3・7・14日後のApoE欠損マウスの各臓器重量変化 (腎臓・肝臓・脾臓・肺・心臓) について検討した。その結果、HbVの主要分布臓器の一つである脾臓において重量の増加が確認されたが (Fig. 5B)、もう一つの主要分布臓器である肝臓においては変化が無かった (Fig. 5A)。また、腎

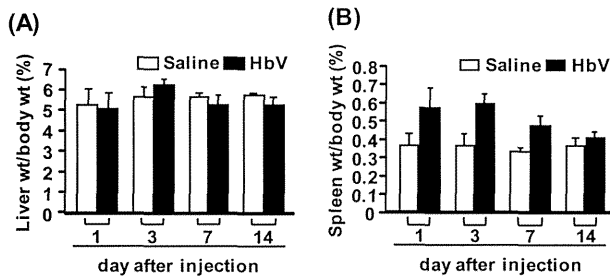


Figure 5
Change in (A) liver and (B) spleen weight at 1, 3, 7 and 14 days after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6. KOR/StmSlc-Apoe^{shl} mice.

The values are mean ± SD. (n=5)

臓・肺・心臓においては臓器重量の変化は確認されなかった (data not shown).

3. 血球パラメータ

Fig.6には、ApoE欠損マウスにHbV投与1・3・7・14日後の血球パラメータ (白血球・赤血球・血小板) を示す。その結果、生理食塩水投与群とHbV投与群の間で顕著な違いは確認されなかった。

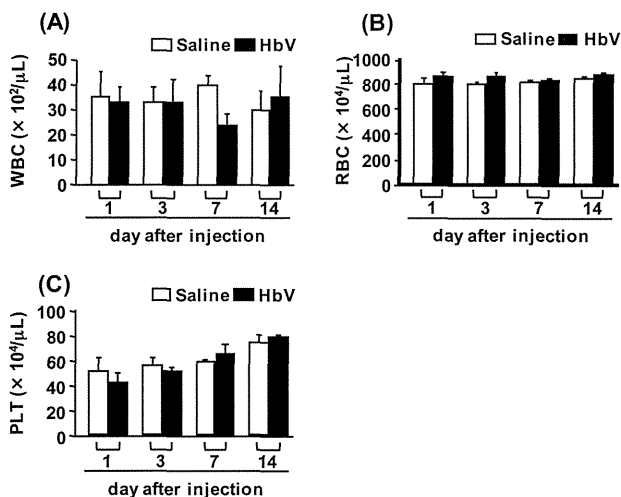


Figure 6
Changes in (A) white blood cells, (B) red blood cells and (C) platelets at 1, 3, 7 and 14 days after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6. KOR/StmSlc-Apoe^{shl} mice.

The values are mean ± SD. (n=5)

4. 生化学パラメータ

ApoE欠損マウスにHbV投与後の血漿パラメータへの影響を検討した。Fig. 7には、ApoE欠損マウスにHbVまたは生理食塩水を投与し、1・3・7・14日後における、総タンパク質・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)・アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)・アルブミン・尿素窒素 (BUN) 及びクレアチニン (CRE) の各値を示す。その結果、肝機能を反映するAST及びALTはHbV投与1日後に一過性の上昇を示したものの、投与後3日目には生理食塩水投与群と同等の値を示した。一方、他の肝機能マーカーである総タンパク質及びアルブミンには、HbV投与による有意な変化は認められなかった。また、腎機能を反映するパラメータ (BUN及びCRE) に変化は無かった。

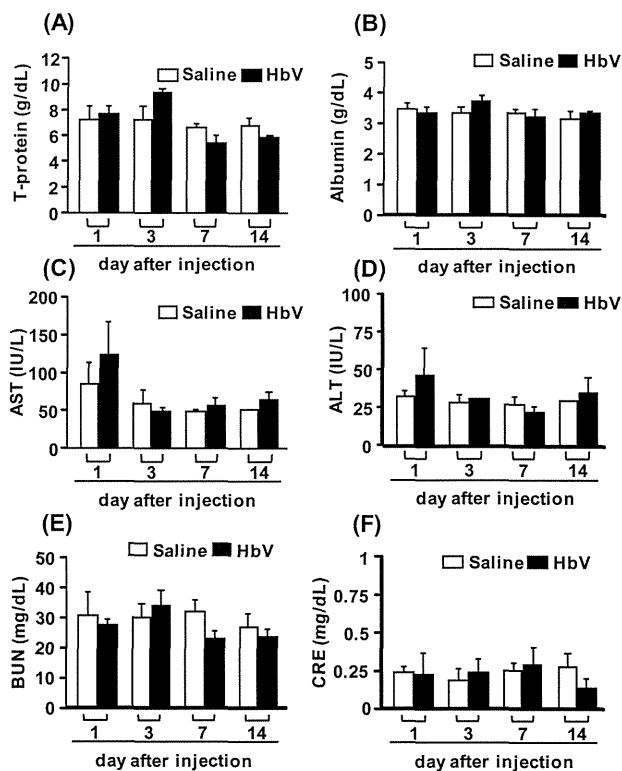


Figure 7
Serum laboratory tests representing liver and renal function at 1, 3, 7 and 14 days after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6. KOR/StmSlc-Apoe^{shl} mice.

The values are mean \pm SD. (n=5)

さらに、ApoE欠損マウスにHbV投与後、1・3・7・14日目における各臓器（腎臓・肝臓・脾臓・肺・心臓）の組織への影響をH.E.染色により評価した。その結果、各臓器において、HbV投与による明らかな形態変化は確認されなかった（Fig. 8）。以上の生化学パラメータ及び組織学的評価の結果より、HbV投与による腎機能及び肝機能への影響はほとんど認められないか、あるいは一過性のものであり、他の臓器も含め、生体への悪影響は少ないものと思われた。

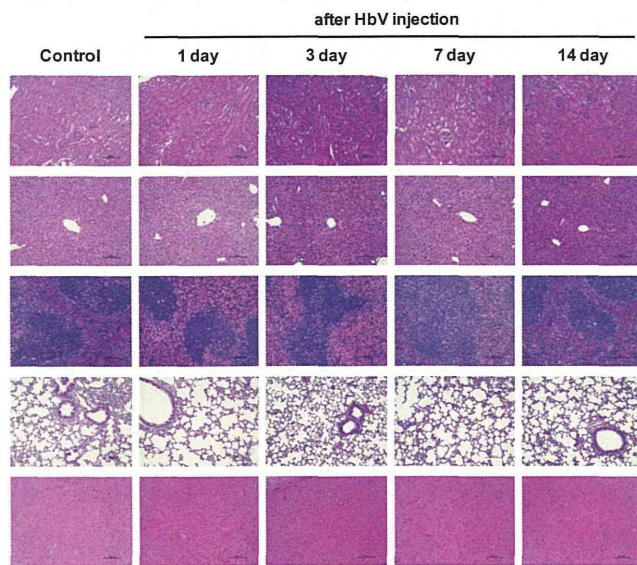


Figure 8
Light micrographs of kidney, liver, spleen, lung and heart in B6. KOR/StmSlc-ApoE^{shl} mice at 1, 3, 7 and 14 day after HbV injection (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) stained with H&E.

次に、HbV構成成分由来代謝物の血漿パラメータをFig. 9に示す。その結果、強度は異なるものの、評価した全ての脂質膜成分の代謝の指標となるパラメータ（トリグリセリド・リン脂質・遊離脂肪酸・総コレステロール・エステル型コレステロール及びフリーコレステロール）は、ApoE欠損マウスにおいて生理食塩水投与群に比べて、HbV投与後1・3日目に上昇を示した。しかしながらこれらの

値は、投与後7日目には生理食塩水投与群と同等の値まで回復した。これらの結果より、ApoE欠損マウスにおいて、HbVは細網内皮系細胞による代謝され、HbV代謝物が血中に放出されることにより上述した脂質関連パラメータが一時的に上昇するものの、7日目までに分解・排泄されると考えられた。

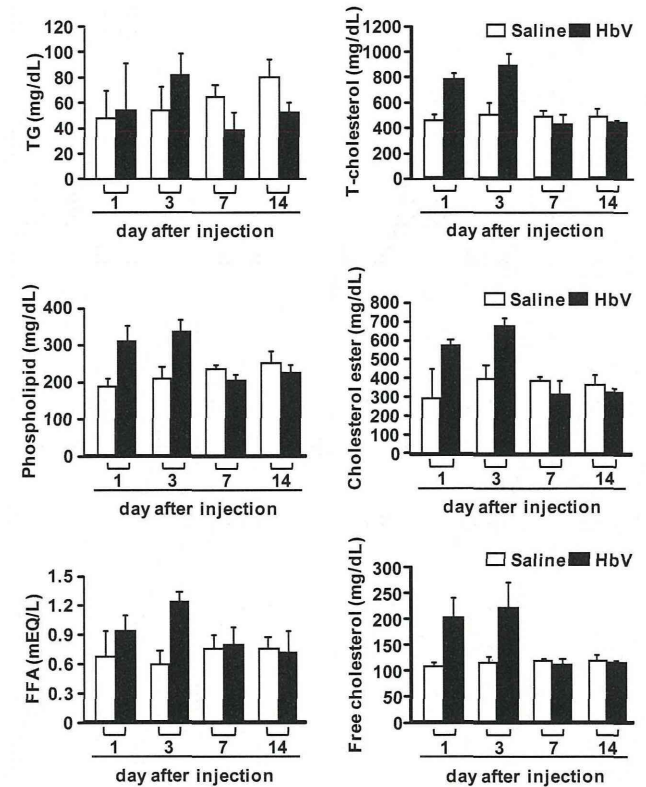


Figure 9
Serum laboratory tests representing the metabolism of lipid at 1, 3, 7 and 14 days after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6. KOR/StmSlc-ApoE^{shl} mice.

The values are mean \pm SD. (n=5) TG; triglyceride, FFA; free fatty acid, T-cholesterol; total cholesterol

5. 体内動態評価

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. 10)。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. 11)。

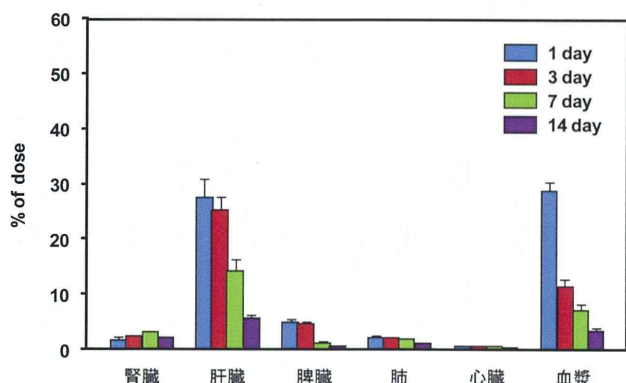


Figure 10
Tissue distributions (% of dose) of ³H-HbV at 1, 3, 7, 14 day after administration to B6. KOR/StmSlc-ApoE^{sh1} mice.
Each point represents the mean ± SD (n=5).

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。

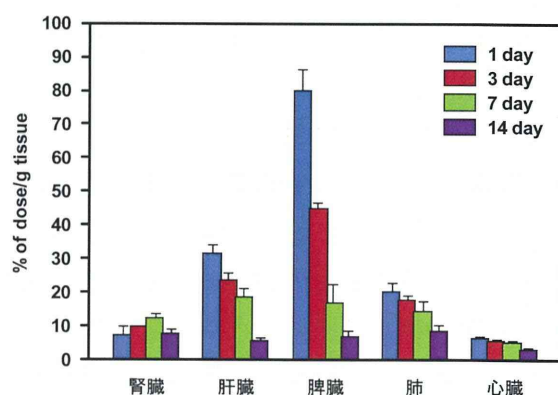


Figure 11
Tissue distributions (% of dose/g tissue) of ³H-HbV at 1, 3, 7, 14 day after administration to B6. KOR/StmSlc-ApoE^{sh1} mice.
Each point represents the mean ± SD (n=5).

D. 結論

万人へHbVを安全に使用するためには、脂質代謝異常時におけるHbV使用の安全性評価を検討する必要がある。ここで、HbVは赤血球代替物であるため、通常の薬物とは異なり大量投与が想定される。そのため、一般的な薬物に比べ、脂質の代謝及び排泄能が低下した状態ではHbV及びその構成成分が生体内に蓄積し、予期せぬ副作用を生じることが懸念される。本研究より、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) しても臓器傷害性を示さず、また、HbV構成成分由来代謝物の血漿パラメータ値が投与後7日目までに回復しており、脂質代謝異常時においてもHbVは十分な代謝・排泄性を持っていることが示唆された。この結果は、ApoE欠損マウスを用いた体内動態実験結果からも裏付けられる。本研究結果のみでHbVが高脂血症時に安全であると結論付けるのは早計であるが、生体蓄積性は殆ど無く、少なくとも動物実験レベルでは安全であると考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

15. CO-HbVの特発性肺線維症への有用性評価

A. 研究目的

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送達は可能であると考えられる。

以上の背景より、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. 動物

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. IPF モデルマウスの作製

Sea-ICR マウスに非絶食、抱水クロラール麻酔下において、ブレオマイシン (5 mg/kg) を経気道投

与することにより作製した。

4. 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 (1000 mg Hb/kg) または CO-HbV (1000 mg Hb/kg) を尾静脈より投与した。

5. 肺組織評価

ブレオマイシン投与後 14 日目の肺を PFA で固定しパラフィンで包埋後、切片を作製した。作製した切片を HE 染色、Masson's trichrome 染色を行い、その形態の観察を行った。HE 染色はヘマトキシリンにより核を紫に、細胞質を赤く染色し、Masson's trichrome 染色は鉄ヘマトキシリンにより核を黒く、ポンソーにより細胞質を赤く、最後にアニリンブルーにより膠原線維を青く染色した。

6. 肺組織中のヒドロキシプロリン量の測定

ブレオマイシン投与後 14 日目の肺に 50% TCA を加えホモジナイズし、その沈殿物に HCl を加え 110°C, 16hr インキュベーションすることで肺を粉々にした。組織中のヒドロキシプロリンを chloramine T で酸化後、Ehrlich's 試薬で呈色し、550nm の吸光度を測定することでヒドロキシプロリンの定量を行った。

7. 肺機能の測定

ブレオマイシン投与後 14 日目に高性能呼吸機能解析システム (FlexiVent; SCIREQ, Montreal, Canada) を用いて測定を行った。抱水クロラールによる麻酔下のマウスに気管開口術を施し、金属性チューブを気管内に挿入後、機械的な人工呼吸状態とした。Total respiratory system elastance と tissue elastance は、snap shot によって測定し、努力肺活量 (FVC) は、FlexiVent software (version 5.3) を用いて解析した。

8. 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の細胞数及び種

類評価

ブレオマイシン投与3日後にPBS/Heparinで肺胞洗浄 (BAL) を行った。回収液を遠心後BAL cellとBALFに分け、BAL cellはNaCl等張液で溶血後、サイトスピンを用いてスライドガラスにスミアした。スライドガラスにスミアした細胞はDiff Quik solutionにより染色後、総細胞数と種類別の細胞数を測定した。

9. 肺組織中の炎症性サイトカイン量の測定

ブレオマイシン投与後7日目の肺にBuffer (PBS, 1% PI mix, 10 mM EDTA, 0.05% Tween20) を500 μ L加えホモジナイズし、15,000 rpm, 4°C, 10 minで遠心した上清を用いてELISAキット (BioLegend) の手順に従って測定を行った。

10. 肺組織の免疫染色 (8-OHdG, ニトロチロシン)

ブレオマイシン投与後3日目の肺をPFAで固定しパラフィンで包埋後、切片を作製した。作製した切片を抗8-OHdG抗体、抗ニトロチロシン抗体を用いて免疫染色し、顕微鏡で観察を行った。

11. 肺組織の膜分画単離

ブレオマイシン投与後7日目の肺を回収し、1 mL SHE bufferを加えてホモジネートを行った。得られた肺組織破砕液を2回遠心 (1回目: 720 G, 4°C, 5 min, 2回目: 10,000 G, 4°C, 5 min) することで未破砕組織と核分画の混合物である沈殿を除去し、上清を得た。この上清はさらに超遠心 (100,000G, 4°C, 1時間) し、沈殿物をHBST bufferで溶解させ、膜分画として回収した。

12. 肺組織膜分画のWestern Blotting (Nox4)

回収した膜分画をBCA法によりタンパク定量し、HBST bufferを用いてタンパク濃度を揃えたサンプルを調製した。12.5% ポリアクリルアミドゲルにてSDS-PAGE後、PVDF膜へ転写し、5% スキムミルクによるブロッキング (RT, 2 hr)、一次抗体反応

(RT, 1 hr→4°C, over-night)、二次抗体反応 (RT, 1 hr) を行った後、発光試薬 (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) と反応させ、LAS 3000 mini (FUJIFILM) で発色強度の検出を行った。

13. 肺組織の免疫染色 (Nox4)

ブレオマイシン投与後7日目の肺をOCT compoundで固定化させ、クリオスタットを用いて凍結切片を作製した。作製した切片を抗Nox4抗体を用いて免疫染色し、顕微鏡で観察を行った。

14. Dihydroethidium (DHE) 染色

ブレオマイシン投与後7日目の肺をOCT compoundで固定化させ、クリオスタットを用いて凍結切片を作製した。作製した切片にDHE (5 μ M) を添加し、37°C、30分間、遮光でインキュベートさせた。その後、遮光においてPBSで1回washを行い、グリセロールで封入した。さらに、585 nmの励起光を照射して切片を観察した。

15. 肺組織中のTGF- β 量の測定

ブレオマイシン投与後14日目の肺にBuffer (PBS, 1% PI mix, 10mM EDTA, 0.05% Tween20) を500 μ L加えホモジナイズし、15,000 rpm, 4°C, 10minで遠心した上清を用いてELISAキット (R&D Systems) の手順に従って測定を行った。

C. 結果および考察

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 (Fig. 12A)。また、細胞種別の評価では、主に肺胞マクロファージ (Fig. 12B) と好中球 (Fig. 12C) 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、それらの浸潤を抑制していた (Fig. 12)。

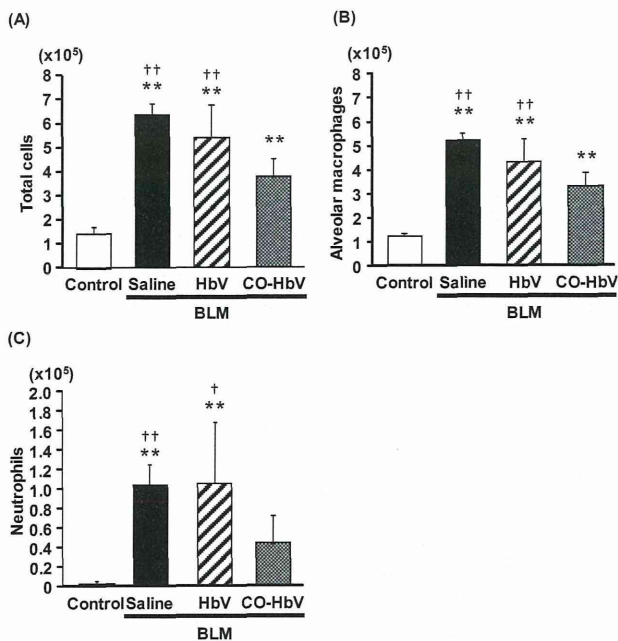


Figure 12
Effect of CO-HbV on cells in bronchoalveolar lavage fluid in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice.

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.

2. 肺線維化の評価

肺線維化の評価を、Masson's trichrome染色と、ヒドロキシプロリンの定量により行った。Masson's trichrome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 (Fig. 13A)。また、ヒドロキシプロリンを定量した結果、Masson's trichrome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 (Fig. 13B)。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。

3. 肺機能評価

CO-HbV投与による肺機能への効果について評

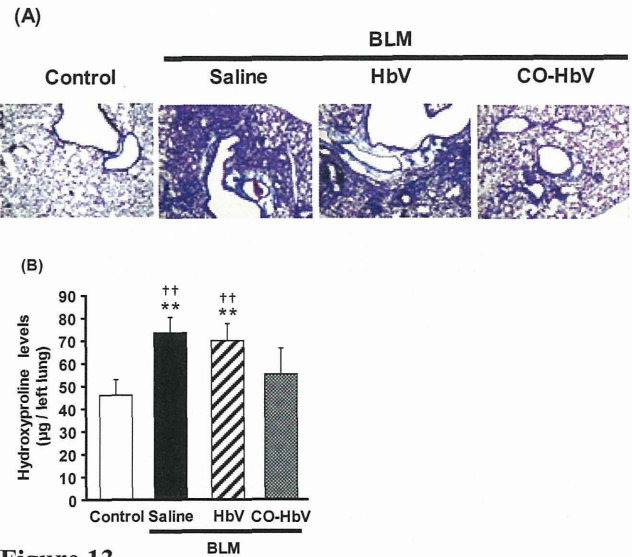


Figure 13

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

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

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 (Fig. 14A)。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 (Fig. 14B 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。

4. 肺組織中サイトカインの評価

代表的な炎症性サイトカインであるTNF- α , IL-6, IL-1 β の肺組織中の産生量をELISAによって評価した結果、ブレオマイシン投与による炎症性サイトカインの増加は、CO-HbVを投与することで顕著に抑制されることが確認された。 (Fig. 15)

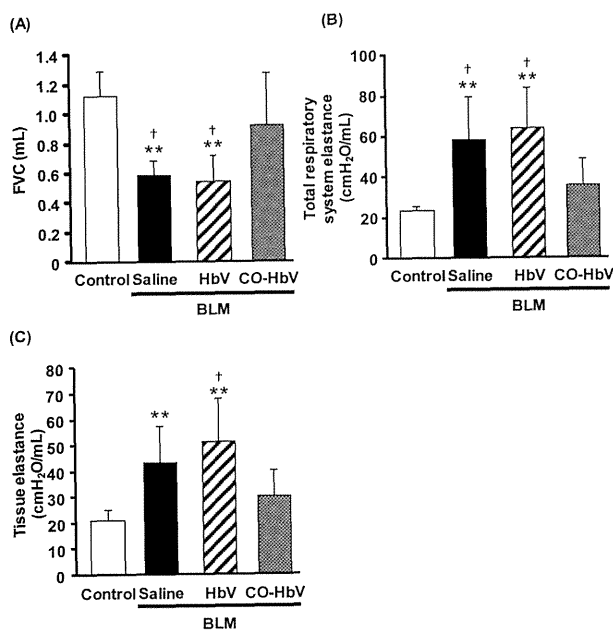


Figure 14
The lung mechanics and respiratory functions after saline, HbV or CO-HbV treatment on day 14 in bleomycin -induced pulmonary fibrosis mice.

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.

5. 肺組織中の酸化ストレスマーカーの評価

次に、初期の酸化ストレスについて、核酸またはタンパク質の酸化ストレスマーカーである8-OHdG とニトロチロシンの免疫染色を行った。生理食塩水投与群では、明らかな酸化産物の蓄積が認められるのに対して、CO-HbV 群では、蛍光がほとんど観察されず、CO 投与による酸化ストレスの抑制が示唆された。(Fig.16A)

さらに、活性酸素種 (ROS) 産生源としてNox4に着目した。実際にIPF患者の線維芽細胞において、Nox4の発現が上昇していることや、Nox4欠損マウスはブレオマイシン誘発肺線維症を抑制することが報告されている。そこで、肺組織中のNox4発現量を調べたところ、ブレオマイシン投与によって明らかな発現上昇が認められたが、生理食塩水、HbV、CO-HbV群の3群間で発現量に差はなかった

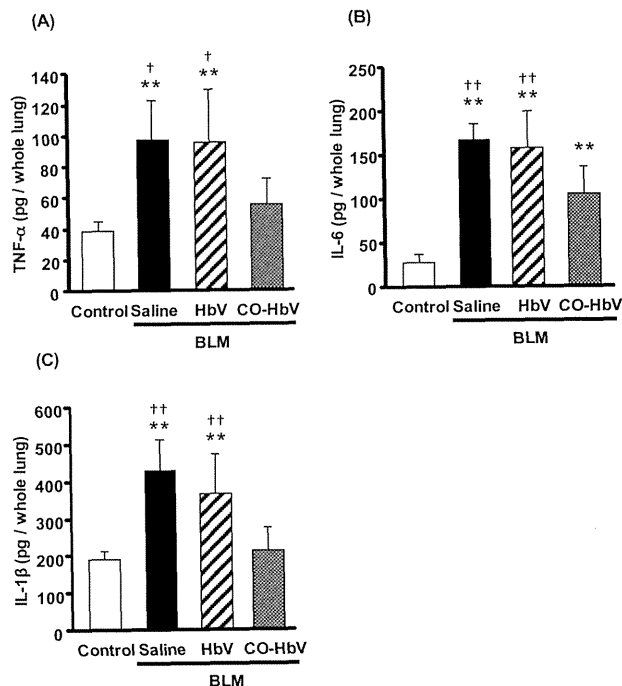


Figure 15
Effect of CO-HbV on pulmonary inflammatory cytokines and chemokines in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice.

The levels of cytokines and chemokine including (a) TNF- α , (b) IL-6 and (c) IL-1 β in lung tissue on day 7. The amount of inflammatory cytokines and chemokine in whole lung tissue was measured by ELISA. Each value represents the mean \pm s.d. (n=5). **P<0.01 versus control. ††P<0.01 versus CO-HbV. †P<0.05 versus CO-HbV.

(Fig.16C and D)。しかし、非常に興味深いことに、スーパーオキシドの産生を反映するDHE染色によって、ROS産生量を評価したところ、CO-HbV群でのみROS産生量の顕著な減少が認められた (Fig. 16B)。ここで、Nox4の免疫染色およびDHE染色は、同一の肺組織切片を用いて検討を行っており、この2つの検討結果を比較すると、CO-HbVは、Nox4の発現量には影響を及ぼさないものの、その活性を抑制していることが推察された。

6. TGF- β の発現評価

最後に、線維化因子のひとつであるTGF- β について評価した。Nox4由来のROSはTGF- β を活性化し、この活性型TGF- β が線維芽細胞の筋線維芽細胞への転化 (EMT) を誘導することで線維化が進

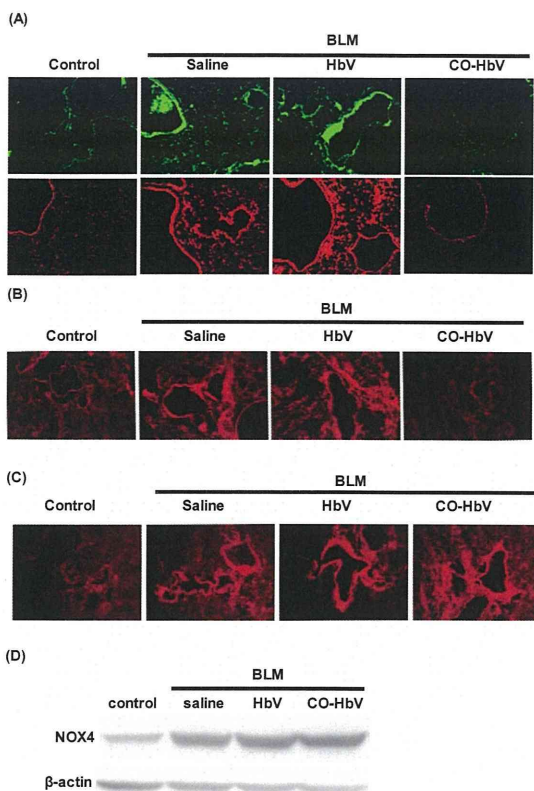


Figure 16
Effect of CO-HbV on the generation of reactive oxygen species in lung tissue in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice.

(A) The immunostaining of the lungs slice for the oxidative stress markers of nucleic acid (8-OH-dG; upper) and amino acid (NO₂-Tyr; lower). (B) Production of pulmonary superoxide in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice on day 7 after BLM administration. (C-D) The protein expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (Nox4) in lung tissue. Protein expression levels of Nox4 was determined by (C) immunostaining and (D) western blotting.

行していくため、TGF-βは線維化の中心的な原因と考えられている。そこで、肺組織中の活性型TGF-βを測定した結果、生理食塩水投与群における活性型TGF-βの産生増加に対して、CO-HbV群では、その抑制が認められた (Fig. 17)。このことから、CO-HbV投与により、線維化を誘発する活性型TGF-βの産生が抑制されることが判明した。

D. 結論

本研究では、CO-HbVがIPFに対して有効な治療薬となり得る可能性を示した。IPFは、原因不明の

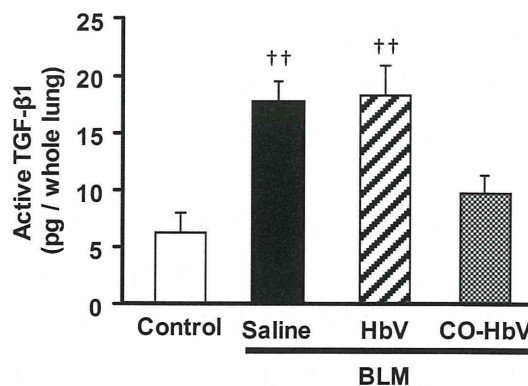


Figure 17
Effect of CO-HbV on active TGF-β1 levels in bleomycin -induced pulmonary fibrosis mice.
 Active TGF-β1 levels in lung were determined on day 7. Each value represents the mean ± s.d. (n=6). ††P<0.01 versus CO-HbV.

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。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。

以上より、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ても有効であ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

16. ヘモグロビン小胞体がサイトカイン・ケモカインの産生動態に与える影響について

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既に見出している。しかしながら、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。そこで、培養上清中に分泌されてくるサイトカイン・ケモカインを測定しこの事を明らかにする事を目的とした。

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(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(10% FCS加RPMI1640)に再浮遊し脾細胞浮遊液(1 \times 10⁶/ml)とした。その後、細胞浮遊液を24 well plateに1 mlずつ分注し、Con A (0, 0.3 μ g/ml)存在下で、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件のもと、培養を開始した。また、種々の濃度のLipopolysaccharide (LPS)存在下で24時間培養した。

2. 培養上清中のサイトカイン・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- β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IFN- γ 、IL-10、IL-12p、IL-13、IL-17A、IL-18、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-3 α 、RANTES、Gro/KC、TNF- α 、M-CSFの18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。測定はすべて原則triplicateで行なった。TGF- β 1は、別途rat TGF- β 1 assay kit (R&D)を用いて測定した。LPS存在下に24時間培養した培養上清も同様に回収し、上清中のIL-1 β 濃度を、rat IL-1 β assay kit (R & D)を用いて測定した。

C. 研究結果

1. 培養上清中に分泌されるサイトカイン・ケモカイン

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(Fig. 1-5)、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、経時的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CCケモカインである、MIP-1 α (CCL3)、RANTES (CCL5)そしてMIP-3 α (CCL19)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Con A刺激後72時間まで産生され続けてい

