

図3 direct EACバルーン
上行大動脈に直接挿入し、大動脈遮断、
心筋保護液注入、圧測定を果たす

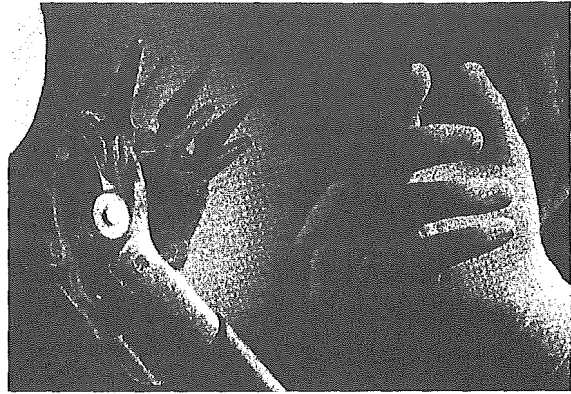


図4 術者の手の動きに合わせて動くエンドリスト

3 大動脈遮断方法

Port-access心臓手術では胸壁にある1つの小切開および複数のportが唯一の心臓に到達する経路であるため、心臓停止のための上行大動脈遮断は、通常使われている遮断鉗子では行えない。そこで開発された大動脈遮断方法には大きく分けて2通りある。①血管内腔から遮断する方法（endoaortic clamp法；EAC法）、②血管外壁から遮断鉗子を用いて行う方法（aortic cross clamp法；AXC法）である。EAC法に用いるバルーンには、米国Heartport社で開発されたHeartportシステムによるものがあり、バルーンを下肢末梢動脈から挿入し、上行大動脈まで進め、バルーンを膨らませ血流を遮断するものである。また、われわれは小切開創から上行大動脈に直接挿入できるdirect EACバルーンを独自に開発し使用している（図3）。

MICSにおけるロボットの導入（da Vinci[®]を用いた心臓手術）

da Vinci[®]システムは、オペレーターがロボットを実際に操作する場所である①術者コンソール、実際に手術を行う部分で内視鏡とロボットの左右の腕（図4）-アームを持つ②手術アームカート、コンソールでオペレーターが見ている内視鏡の高画質立体（3D）画像を外部に映し出す③ビジョンシステムの3つの部分から構成されている。①の術者コンソールは患者のいる場所と離れており、別室に設置することも可能である。従ってオペレーターは静かな場所で手術に集中することができる。

MICSにおける今後の展望

わが国においては、MICSが欧米ほど広く行われていないことは事実である。そして伝統的な開心術の習得後に新たなMICSのための習得期間 (learning curve) があることも事実である。しかしながら、患者サイドに立った医療が求められ、その結果、患者の肉体的、精神的負担の軽減を目的とする低侵襲手術への志向が強くなり、医療経済からみて効率的な医療、すなわち回復期間が短く医療費削減に効果がある医療が求められている現代において、これらの技術が心臓外科手術法の1つのオプション、あるいはメニューになっていくことは確実であると考えられる。今後の技術革新によりさらなる発展がなされ、多くの患者に利益がもたらされることを期待したい。

参考文献

- 1) Litynski, GS. Profiles in laparoscopy. Mouret, Dudois, and Perissat. the laparoscopic breakthrough in Europe (1987-1988). JLS. 3, 1999, 163-7.
- 2) Benneti, FJ. et al. Video-assisted coronary bypass surgery. J Card Surg. 10, 1995, 620-5.
- 3) Cosgrove, DM. et al. Minimally invasive approach for aortic valve operation. Ann Thorac Surg. 62, 1996, 596-9.
- 4) Ryohei, Y. et al. Minimally Invasive Cardiac Surgery by the Port-Access Method. Artificial Organs. 26, 2001, 430-7.
- 5) Ryohei, Y. et al. Port-Access minimally invasive cardiac surgery. Experience with 34 cases at Keio University Hospital. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg. 49, 2001, 360-4.
- 6) 四津良平 ほか. 低侵襲心臓手術のアプローチ法の変遷—慶應義塾大学病院における136例の検討—。慶應医学。78, 2001, 151-8.
- 7) 四津良平. Minimally invasive cardiac surgery (MICS). 新井達太 編. 心臓弁膜症の外科. 第2版. 東京, 医学書院, 2003, 503-25.
- 8) 四津良平. Port-Access法による弁膜症を中心とした心内修復術. 許俊鋭 編. 低侵襲心臓手術. 東京, 診断と治療社, 2002, 146-55.
- 9) Carpentier, A. et al. Computer-assisted cardiac surgery. Lancet. 353, 1999, 379-80.

特集

プランナー
慶應義塾大学医学部
外科（心臓血管）
教授
四津良平



循環を補助する医療機器を 理解しよう

心不全患者に対する循環の補助は、IABP、PCPS、LVASなどをタイミングよく適切に使い分け、チーム医療を行いながら患者の状態を把握し、合併症防止やウィーニングを円滑に行うことが必要です。また、わが国における人工心肺装置を用いた心臓手術は年間4万例以上にものぼり、操作法は患者の生命に直結するがゆえに医師や臨床工学技士のみならず、看護師にも装置の理解が求められます。医療チーム全員が互いの業務をチェックし合える体制が理想であるといえるでしょう。CHD・CHDF（持続的血液浄化）はcritical careにおいて患者管理の重要なデバイスであり、異常時においてはベッドサイドにいる看護師に迅速な対応が求められます。ペースメーカー治療は、患者の状態、訴え、年齢、ライフスタイルを考慮しなければならず、それらの聴取には看護師の治療への理解は必須です。

本特集では、これら「循環を補助する医療機器」を分かりやすく解説していただきました。「円滑なチーム医療」に役立てていただければと思います。



International Congress Series 1255 (2003) 95–97

Genetic polymorphisms in the promoter region of interleukin-8

Seitaro Fujishima^{a,*}, Sadakazu Aiso^b, Shingo Hori^a,
Katsunori Aoki^a, Naoki Aikawa^a

^aDepartment of Emergency and Critical Care Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi,
Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan

^bDepartment of Anatomy, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku,
Tokyo 160-8582, Japan

Received 26 February 2003; accepted 4 March 2003

Abstract

In septic patients, local and systemic production of interleukin-8 (IL-8) is augmented, and we and other researchers have previously shown that serum IL-8 levels predict the development of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and poor prognosis. There is a wide variation in IL-8 levels among septic patients under similar conditions and this is, at least, partly due to the genetic variability, in addition to the differences in predisposing stimuli. Thus, in the present study, we examined single nucleotide polymorphisms (SNPs), which may affect the production of IL-8. After obtaining informed consent, we draw 10 ml of heparinized blood and extracted DNA. We initially sequenced the 300-bp promoter region of the IL-8 gene in 25 Japanese healthy volunteers and confirmed one SNP at position –251, which was identical to the previously reported SNP in Caucasians. By further analysis of IL-8 genotype by RT-PCR in 100 Japanese healthy volunteers, the genotype distribution (A/A:A/T:T/T) was 16:47:37, suggesting the similar IL-8 genotype distribution between Japanese and Caucasians. We then examined the IL-8 genotype in 10 septic patients as a preliminary study and it was 1:3:6. Additional experiments are ongoing to determine its significance.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Chemokine; Sepsis; Systemic inflammatory response syndrome; Acute lung injury; Single nucleotide polymorphism

* Corresponding author. Tel.: +81-3-3225-1323; fax: +81-3-3353-2232.

E-mail address: fujishim@sc.itc.keio.ac.jp (S. Fujishima).

1. Background

In patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS), especially sepsis, local and systemic production of pro-inflammatory cytokines, including interleukin-8 (IL-8), is augmented [1]. IL-8 is a member of the C–X–C chemokines with a potent neutrophil chemotactic and activating activity and we and others have previously shown that serum IL-8 levels predict the development of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and poor prognosis in septic patients [2]. Furthermore, in a rabbit model of re-expansion lung injury, we showed that pretreatment with anti-IL-8 antibody attenuated acute lung injury in association with the decreased neutrophil accumulation to the lungs [3].

There is a wide variation in IL-8 levels among septic patients under similar conditions. The variation in lung IL-8 levels were also observed in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and this is, at least, partly due to the genetic variability, in addition to the differences in quality and strength of predisposing stimuli. Thus, in the present study, to examine the contribution of IL-8 gene polymorphisms to the pathophysiology of sepsis, we examined single nucleotide polymorphisms (SNP), which may affect the production of IL-8.

2. Materials and methods

After obtaining informed consent, we drew 10 ml of heparinized blood and extracted DNA. To find polymorphisms, we initially sequenced the 300-bp promoter region of the IL-8 gene in 25 Japanese healthy volunteers. We then examined the identified SNP at –251 in 100 Japanese healthy volunteers and 10 septic patients, using a method of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

3. Results and discussions

In search of new SNPs, which may affect IL-8 production, we directly sequenced the initial 300 bp of IL-8 promoter region and found one A/T SNP at position –251.

By further analysis of the –251 SNP by PCR-RFLP, we determined the genotype distribution in healthy volunteers and septic patients (Table 1). The A allele frequency at –251 was 0.4.

The existence of –251 A/T IL-8 SNP was initially reported from England [4]. The frequency of A allele was 0.44 in this paper, whereas it was 0.4 in our study, indicating the similar allele distribution between Caucasians and Japanese.

Table 1
L-8 genotype distribution in Japanese healthy volunteers and septic patients

Genotype	A/A	A/T	T/T
Healthy volunteers ($n=100$)	16 (16%)	47 (47%)	37 (37%)
Sepsis ($n=10$)	1 (10%)	3 (30%)	6 (60%)

The association of –251 A/T SNP has been revealed in several diseases, including respiratory syncytial virus bronchiolitis and nephritis complicating cutaneous vasculitis [4,5]. Although we cannot determine its significance in sepsis from the current preliminary study, since IL-8 is playing pivotal roles in the pathophysiology of sepsis, ARDS and MODS, it is quite possible that the –251 SNP contribute to the susceptibility or severity of sepsis.

4. Conclusion

We found one SNP within the 300-bp promoter region of IL-8 gene in Japanese and it was identical to the SNP reported previously in Caucasians. In further analysis, we confirmed its common existence in the Japanese population. Further analysis is ongoing to determine its significance in sepsis, ARDS and MODS.

References

- [1] S. Fujishima, N. Aikawa, Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation, *Intensive Care Med.* 21 (1995) 277–285.
- [2] S. Fujishima, J. Sasaki, Y. Shinozawa, K. Takuma, H. Kimura, M. Suzuki, M. Kanazawa, S. Hori, N. Aikawa, Serum MIP-1 α and IL-8 in septic patients, *Intensive Care Med.* 22 (11) (1996) 1169–1175.
- [3] M. Nakamura, S. Fujishima, M. Sawafuji, A. Ishizaka, T. Oguma, K. Soejima, H. Matsubara, S. Tasaka, K. Kikuchi, K. Kobayashi, E. Ikeda, M. Sadick, C.A. Hebert, N. Aikawa, M. Kanazawa, K. Yamaguchi, Importance of interleukin-8 in the development of reexpansion lung injury in rabbits, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000) 1030–1036.
- [4] J. Hull, A. Thomson, et al., Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families, *Thorax* 55 (12) (2000) 1023–1027.
- [5] M.M. Amoli, W. Thomson, et al., Interleukin 8 gene polymorphism is associated with increased risk of nephritis in cutaneous vasculitis, *J. Rheumatol.* 29 (11) (2002) 2367–2370.

熱傷ショックの病態と治療法の変遷

慶應義塾大学医学部救急医学

相川直樹

要旨

熱傷ショックの発生機序は、熱傷皮膚・皮下組織の血管透過性亢進による血漿成分の血管外移行を主体とする fluid depletion で、oligemic shock ではあるが出血性ショックと異なり、受傷直後では高度の血液濃縮と血管収縮からなる全身血管抵抗の異常増加が特徴的である。十分な輸液を投与された患者では受傷 24 - 48 時間後には hyperdynamic state に移行する。筆者は 1973 年に初めて重症熱傷患者に肺動脈カテーテル法を施行して循環動態を測定、熱傷ショックの病態の全貌解明に努めてきた。動物実験で皮膚熱傷から離れた部位である、肺胞血管膜の透過性亢進がおこることを見出し、受傷 6 時間後にはそのピークが過ぎることから、この時期以降のコロイド輸液の妥当性を提唱、さらに新鮮凍結血漿投与による心機能の改善を明らかにした。Brooke や Parkland などの輸液公式を frame of reference とし、循環動態モニターに立脚した individualized fluid resuscitation program を提唱した。このような患者ごとに個別化した呼吸・循環・体液管理の導入により、広範囲熱傷壊死組織の切除術をショック期においても安全に施行することが可能となった。コロイド投与の是非については、更なるエビデンスの収集が必要である。

1. はじめに

広範囲の体表に熱傷を受けた患者に対して、受傷後早期から適切な輸液療法を施行しないと、患者は、受傷直後から急速に進行する急性循環不全、いわゆる熱傷ショックに陥り(1)、血圧低下、急性腎不全、意識障害などを呈し、多臓器不全から重篤となるものもある(2)。かつては熱傷ショックが重症熱傷患者の主要な死因であったが、過去半世紀にわたるその病態解明と輸液療法を中心とした治療法に関する研究の結果、今日では熱傷患者のショックによる死亡は激減し、重症熱傷患者の予後は目覚しく改善された。

この度、第 18 回日本 shock 学会学術集会の会長講演として、小職の研究分野である熱傷ショックを採りあげ、その病態解析の成果と病態の理解に基づいた治療法の変遷について、その概要を纏めておくこととした。

2. 熱傷ショックの病態

1) 熱傷による体液変動

熱傷ショックの病態については、既に 1930 年代に Blalock が、動物実験で熱傷局所における体液喪失を指摘しているが(3)、熱傷ショックの主たる発生要因は、熱傷受傷部位の皮膚・皮下組織の血管透過性亢進による血漿成分の血管外移行を主体とする fluid depletion である。

Ishibiki ら(4)は、Ⅲ度熱傷モデルにおいて熱傷部位の水分と血漿蛋白の移行を検討し、熱傷局所では受傷直後から水と血漿蛋白が血管外に漏出するが、そのピークは受傷後 2 - 3 時間であり、受傷後 48 - 72 時間には血管透過性はほぼ正常化することを明らかにしている。

熱傷患者において、受傷後 8 時間以内の熱傷水疱液の成分を分析すると、ナトリウム、カリウム、塩

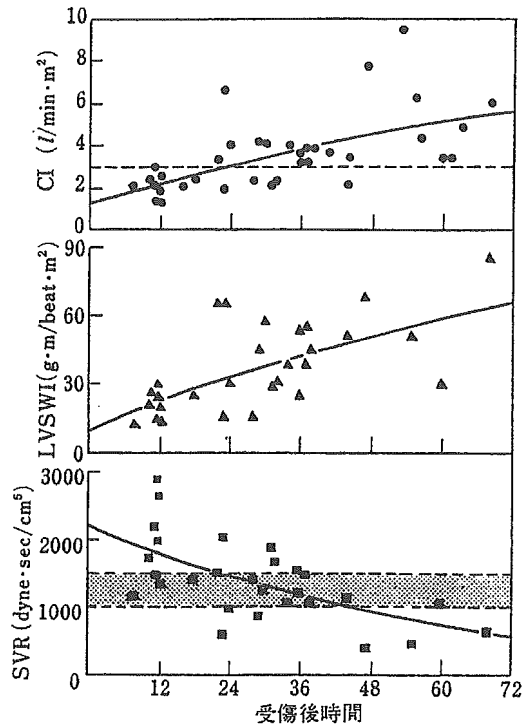


図1 広範熱傷患者における循環動態の変動
(Aikawa, N. et al.: Am. J. Surg., 135: 811, 1978 より引用)

素などの電解質や尿素などの分子量の小さい物質の水疱液中濃度は血漿中濃度とほとんど等しいが、蛋白質濃度は4.9 g/dl、アルブミンは3.2 g/dl含まれており(1)、熱傷局所で、コロイド分子に対する血管透過性亢進が起こっていることがわかる。

一方、筆者らは熱傷局所から離れた部位における血管透過性について明らかにする目的で、ラットの皮膚熱傷後の肺における蛋白質の血管外移行を検討した。尾静脈から静注した horseradish peroxidase (HRP; 分子量約4万) をトレーサーとして用い、8%BSAの皮膚熱傷後経時的に broncho-alveolar lavage (BAL) を施行、BAL液中の血漿蛋白質とHRPを測定して、蛋白分子のBAL液への移行を測定したところ、皮膚熱傷3時間後にはBAL液中の蛋白質が増量するとともに、HRPもBAL液中に出現し、これら蛋白分子の漏出は受傷後6時間でピークとなり、その後は透過性が正常に復することが明らかとなった(5)。

熱傷局所における血管透過性亢進は、主に、毛細血管壁の熱による直接損傷からおこるものと考えられているが、熱傷局所から離れた部位の血管透過性亢進は、熱傷局所で産生されるサイトカインなどのメジエータとした全身性炎症反応によるものである。

2) 循環動態の変動

熱傷ショックは、その主要病因が血漿成分の血管外移行であることから、ショックの分類としては、oligemic shockの範疇に入る。しかし、同じ oligemic shock であっても、全血が失われる出血性ショックとはその病態は異なる。

筆者は、1973年に初めて重症熱傷患者に肺動脈カテーテル法を施行して循環動態を測定(1,6)するとともに、酸素消費量とカテコールアミン(7)、レニン・アンギオテンシン・アルドステロンと腎機能(8,9)、atrial natriuretic polypeptide (ANP)(10)、FeNa(11)などの変動を検討して熱傷ショックの病態解明に努

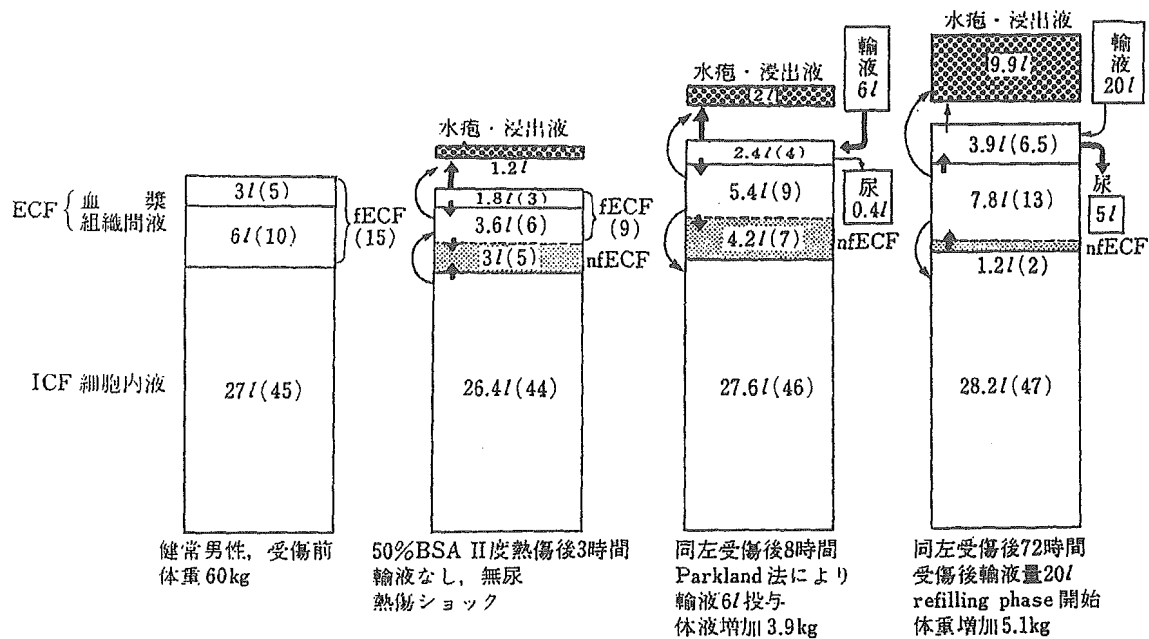


図2 熱傷患者の体液変動(典型例)

体重60kgの男性における平均的体液量の変化を示す。()は受傷前体重に対する体液量の百分率。fECF, nfECFは、それぞれ機能的、非機能的細胞外液量。水疱・滲出液量には不感蒸泄を含む。水疱・滲出液、輸液量、尿量は受傷後の総計。

め、病態の理解の基づく輸液療法(12)や薬物療法(13,14)を開発してきた。

広範囲熱傷の受傷直後には、熱傷局所における急速な血漿喪失により高度の血液濃縮(hemoconcentration)がみられ、ヘマトクリット値は60%に達する患者もある。一方、熱傷侵襲による高カテコールアミン・高アンジオテンシン血症から高度の血管収縮が起こっている。血液濃縮と血管収縮の結果、全身血管抵抗は異常に高く、このafterloadの亢進と、oligemiaによるpreloadの低下から、心拍出量は異常に低下している。また、腎血流量減少と高アルドステロン・高ADH血症とにより乏尿となる。このような患者に対して輸液療法が遅れた場合は、ショックが急速に進行し、急性腎不全、意識障害など多臓器不全から死亡することもある。

一方、受傷直後から十分な輸液を投与された患者では、血液濃縮は正常化し、受傷24-48時間後には、全身血管抵抗と心拍出量は正常化する。受傷48-72時間後には、血管透過性が正常化し、組織間に貯留して非機能化されていた体液が循環系に還流(refilling)するとともに、preloadは増加する。他方、血液濃縮が解消され、侵襲に対するストレスホルモンの反応も減弱し、血管収縮も正常化して、afterloadが低下するとともに、心拍出量は増加し、いわゆるhyperdynamic stateに移行、尿量も増加する(図1)。

実際の医療現場では、輸液療法が施行されるので、典型的な熱傷ショックを観察することは少ないが、動物実験のデータと輸液投与をされた熱傷患者における観察結果から、広範囲熱傷患者に起こっている体液変動と循環動態の変化を纏めると、図2のようになる。

表1. 広範囲成人熱傷患者の輸液計画

1. 乳酸リンゲル液急速投与開始	
2. 尿量 0.7 - 1.0 ml/kg/hr と収縮期血圧 > 100mmHg とを維持するよう輸液量を調節	
3. Swan-Ganz カテーテルによるモニタ(特に、50%BSA 以上で、高齢者・心肺腎に基礎疾患を有する患者、超早期切除術予定患者)	
4. 受傷後 6 - 18 時間でコロイド液投与開始	
5. 下記目標値を得るよう輸液量を調節	
1) 収縮期血圧*	> 100mmHg
2) 脈拍	< 120/min
3) 尿量*	0.7 - 1.0 ml/kg/hr
4) ヘマトクリット	35 - 50 %
5) 血清総蛋白	> 5 g/dl
6) 心係数	> 2.5 l/min/m ²
7) 中心静脈圧(CVP)	2 - 7 mmHg
8) 肺動脈楔入圧(PWP)	2 - 7 mmHg
9) 左室拍出仕事係数(LVSWI)	25 g · m/m ²
10) 全身血管抵抗(SVR)	1000 - 1750 dyne · sec/cm ⁵

*最も優先される2指標

2. 輸液療法の変遷

1) 公式による輸液療法

広範囲熱傷患者に大量輸液が必要なことは、古くから認識されていた。その量は受傷後24時間で15リットル以上となることもある。輸液不足はショックや急性腎不全を招き、過剰輸液は肺水腫などの原因となることから、適切な輸液量算定がショック期の治療の重要な部分となった。

多発外傷などと異なり、熱傷ではその程度が体表面積に対する熱傷面積の割合(%BSA)で定量化されることから、患者の体重と%BSAとから必要輸液量を推定する weight-surface area formulae が提唱された。もっとも最初に実用化された Evans の公式(15)では、受傷後24時間以内の輸液量を、電解質液(生理食塩水) 1.0mL/kg/%BSA, コロイド液を 1.0mL/kg/%BSA 投与するとした。その後、コロイド液を少なめに投与する Brooke の公式、受傷後24時間以内は、乳酸リンゲル液のみを投与する Parkland の公式や Modified Brooke の公式などが提唱されている。これらの詳細は他著(16)に譲る。

2) Individualized Fluid Resuscitation Program

上述した輸液の公式は、広範囲熱傷患者の治療経験に乏しい医師にも、簡便な計算により、比較的安全に輸液療法を行えるようにしたことで意義深いものである。しかし、公式に厳重に従って輸液をすれば、輸液療法に成功するという保証はない。そもそも、Parkland の公式と Modified Brooke の公式では、同じ電解質輸液でも、1日量が2倍も異なっている。公式通りに輸液を施行しても、必ずしも安全ではない。その理由は：(1) 公式は熱傷深度に関して考慮されていない。すなわち、Ⅱ度熱傷と、それより大量の水とナトリウム投与を要するⅢ度熱傷を同等に扱っている、(2) 同程度の熱傷でも、患者により体液変動や循環動態の変動に大きな差異がある、(3) 輸液に対する循環系・腎臓・肺などの反応にも個体差がある、(4) 受傷直後の熱傷範囲(%BSA)の診断にはかなりの誤差がある、などが挙げられる。

実際の輸液療法にあたっては、刻々変化する患者の循環動態と血液検査結果をモニターし、輸液や血管作動薬投与に対する循環動態の反応や血液性状の変化に対応して、輸液速度を調節し、コロイドや薬

剤投与を決めていく必要がある。このような考えから、筆者は1982年に、Individualized Fluid Resuscitation Programなる輸液方法を提唱した(17)。広範囲熱傷患者に対して、まず、Parklandの公式による輸液を開始し、バイタルサイン、尿量、Swan-Ganzカテーテルを用いた循環モニター、血液検査結果などを参考に、表1に示した指標に従って輸液量を調節する方法である。このような、患者ごとに個別化した輸液療法は、特に50%BSA以上の広範囲熱傷で、高齢者や基礎疾患に心肺腎疾患を有する患者、受傷後48時間以内に早期切除術を予定する患者などにおける輸液管理には特に有用である。この、Individualized Fluid Resuscitation Programの論文は、1983年のYear Book of Surgeryにおいても採り上げられた(18)。

3) アルブミン投与の是非

広範囲熱傷患者の輸液療法にはコロイド液としてアルブミン投与が広く行われてきた。前述したように、熱傷局所では血漿蛋白を多量に含む大量の血漿成分が血管外漏出するため、アルブミン濃度は極度に低下する。失われたものを補充し、血液性状を正常化するという観点から、アルブミン投与は妥当な治療法と考えられてきた。しかし、1998年から、コロイド投与の死亡率に与える影響に関してシステマティック・レビューの結果が公表されるようになり(19,20)アルブミン投与の是非について現在でも議論が続いている(21,22)。

その詳細は省略するが、これらの論文の解析対象には、熱傷に対する輸液のほか、外傷、ショック、術中出血などに対する輸液の論文が多く含まれている点、その解釈には注意を要する。熱傷では受傷後早期から高度の血管透過性亢進があり、血漿蛋白が大量に失われることが、他の対象とは異なる。熱傷だけをsubgroupとして層別解析しているデータもあるが、古い論文、症例数が少ない論文、盲検化されていない論文などを含めて分析しているので、現時点ではコンセンサスを得られていない。

4) コロイド投与のタイミング

受傷後24時間以内の輸液の内容として、Evansの公式とBrookeの公式では電解質液の他にコロイド液が投与される。一方、Modified Brookeの公式とParklandの公式では、コロイド液投与は受傷後24時間以降となる。

著者らの、Individualized Fluid Resuscitation Programにおけるコロイド投与のタイミングは両者の中間で、受傷後6-18時間で新鮮凍結血漿投与を開始する。その理由は、熱傷後の血管透過性亢進のピークは、熱傷皮膚で受傷後2-3時間、熱傷から離れた部位では熱傷後6時間で、その後は血管透過性が正常化するという、前述した知見に基づいている。

血漿蛋白濃度の低下によるコロイド浸透圧低下は、肺水腫や心筋の浮腫などを招く点からも、総蛋白濃度をモニターしつつ、受傷後6時間以降にはコロイド投与を開始するほうが、よい結果が得られる。筆者のデータでも、新鮮凍結血漿投与後に心筋機能の改善が認められている(5)。しかしながら、このデータは、新鮮凍結血漿投与によるものであり、新鮮凍結血漿には高濃度のナトリウムや種々の液性因子が含まれていることから、同様の現象がアルブミン液やデキストラン液で再現されるか検証する必要がある。未知のウイルス感染の危険性なども考慮し、今日では新鮮凍結血漿の使用は、早期切除で出血傾向を呈する患者などに限定されるようになった。

5) その他の輸液療法

HLS (hypertonic lactated saline) 療法が提唱されてから四半世紀が経過した。特にⅢ度熱傷では、非機能化する細胞外液の中で、死蔵され非機能化するナトリウム量が非機能化する水分量に比べて多く、等張液ではナトリウムの機能的喪失を十分に補うことができないことから、高張ナトリウム液あるいは高張乳酸加リンゲルを投与するという原理である。米国ではMonafaらのワシントン大学、わが国では大阪大学や杏林大学を中心に行われている。筆者は、HLS療法の経験は無いが、外傷、熱傷、外科手

術の重症患者における高張クリスタロイド輸液に関する 17 件の無作為化対照研究 (熱傷は 4 件) のシステマティック・レビューでは、高張液が等張液に比べて効果的であるというエビデンスは認められていない。(23)。

3. おわりに

日本 Shock 学会総会における会長講演の機会に、熱傷ショックの病態と治療法の変遷について、小職の研究を中心に纏めた。

Sepsis や外傷と異なり、熱傷の侵襲はその onset が特定可能で、侵襲程度を熱傷面積で定量化できる。このため、熱傷は侵襲に対する生体反応の研究対象となり、侵襲の実験的研究においても熱傷モデルが広く使われてきた。熱傷ショックの研究から得られた科学的知見は、熱傷ショックのみならず、種々のショックや多臓器不全の病態解明と治療法の進歩に大きく貢献するものと考えられる。

参考文献

- 1) 相川直樹, 山本修三, 茂木正寿, 他: 熱傷後の循環器系の障害. 熱傷, 5: 139-145, 1980.
- 2) Aikawa N, Shinozawa Y, Ishibiki K, et al.: Clinical analysis of multiple organ failure in burned patients. Burns, 13:103-109, 1987.
- 3) Blalock A: Experimental shock, VII: the importance of the local loss of fluid in the production of the low blood pressure after burns. Arch Surg, 22:610-616, 1931.
- 4) Ishibiki K, Berger A, Burke JF, et al: Plasma-albumin Verschiebungen in der Haut nach zweitgradigen Verbrennungen. Acta Chir Austriaca, 6: 39-142, 1972.
- 5) 相川直樹: 重症熱傷の病態生理; ショックを中心として. 大森清一編, 集中治療医学: ICU の理論と実際; 第 IV 巻, 熱傷. 医歯薬出版, 東京, 1986, p. 99-123.
- 6) Aikawa N, Martyn JAJ, Burke JF: Pulmonary artery catheterization and thermodilution cardiac output determination in the management of critically burned patients. Am J Surg, 135: 811-817, 1978.
- 7) Aikawa N, Caulfield JB, Thomas RJS, et al.: Postburn hypermetabolism: relation to evaporative heat loss and catecholamine level. Surg Forum, 26:74-76, 1975.
- 8) Aikawa N, Wakabayashi G, Ueda M, et al.: Regulation of renal function in thermal injury. J Trauma, 30 (Suppl 1): S174-S178, 1990.
- 9) Shinozawa Y, Aikawa N: Renal failure in burned patients. In: Herndon, DN ed. Total Burn Care; Second Edition. WB Saunders, Philadelphia, 2002, p. 393-398.
- 10) Wakabayashi G, Ueda M, Aikawa N, et al.: Atrial natriuretic polypeptide after burn injury: blood levels and physiological role in rats. Burns, 16: 169-175, 1990.
- 11) 内藤千秋, 相川直樹, 山本修三, 他: 熱傷患者における FeNa テスト. 熱傷, 6:187-192, 1981.
- 12) Aikawa N: Rationale and guidelines of fluid resuscitation in extensive burns. Update Intensive Care Emerg Med, 8: 395-400, 1989.
- 13) Aikawa N, Ishibiki K, Okusawa S, et al.: Use of haptoglobin to prevent renal damage due to hemolysis in extensive third-degree burns. J Burn Care Rehabil, 5: 20-24, 1984.
- 14) 相川直樹: 熱傷ショックの病態と抗ショック療法におけるドパミンの効果. 芦川和高編, ドパミンの臨床; 改定版. 千代田開発, 東京, 1989, p.299-312.
- 15) Evans EI, Purnell OJ: Fluid and electrolyte requirements in severe burns. Ann Surg 135:804-815, 1952.
- 16) 相川直樹, 篠澤洋太郎: 熱傷ショックのモニタリングと輸液療法. 外科診療, 31:1271-1279, 1989.
- 17) Aikawa N, Ishibiki K, Naito C, et al.: Individualized fluid resuscitation based on haemodynamic monitoring in the management of extensive burns. Burns, 8: 249-255, 1982.
- 18) The Year Book of Surgery, 1983 edition, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1983, p.123.
- 19) Schierhout G, Roberts I: Fluid resuscitation with colloid or crystalloid solutions in critically ill patients: a systematic review of randomised trials. BMJ, 316: 961-964, 1998.
- 20) Cochrane Injuries Albumin Reviewers: Human albumin administration in critically ill patients: systemic review of randomized controlled trials. BMJ, 317:235-240, 1998.
- 21) Wilkes MM, Navickis RJ: Patient survival after human albumin administration: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Ann Intern Med, 135:149-164, 2001.
- 22) Alderson P, Schierhout G, Roberts I, et al.: Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients (Cochrane Review). The Cochrane Library, Issue 1, 2003.
- 23) Bunn F, Roberts I, Tasker R, et al.: Hypertonic versus isotonic crystalloid for fluid resuscitation in critically ill patients (Cochrane Review). The Cochrane Library, Issue 1, 2003.

S I R S

Systemic inflammatory response syndrome

特集

相川 直樹*
AIKAWA Naohi藤島清太郎**
FUJISHIMA Seitaro田熊 清継
TAKUMA Kiyotsugu

DICの病態・診断・対策

SIRS が提唱された¹⁾⁻³⁾.

I. SIRS の Clinical Entity

SIRS(systemic inflammatory response syndrome)は, sepsis の定義統一のため1992年に米国でされた概念である¹⁾。「全身性炎症反応症候群」と邦訳されるが, その概念が広く普及した現在ではSIRSが使われることが多い²⁾。

1980年代に始まった sepsis に対する新規治療法の多施設臨床試験において, sepsis の定義統一の必要性が生じたことから, SIRS の概念が誕生した³⁾。感染症を sepsis とするには, 「菌血症を条件とするか」, 「炎症の重症度はどの程度とするか」について当時の米国でも意見が別れていた。このような背景から, American College of Chest Physicians と Society of Critical Care Medicine の合意委員会(ACCP/SCCM Consensus Conference)で, sepsis の定義が検討され, SIRS, sepsis, ならびに sepsis 関連病態の定義と, それらの診断基準が発表された(表1)。この合意では, 種々の侵襲による全身性炎症状態を SIRS とし, 感染症による SIRS を sepsis とした。また, sepsis でなくとも外傷, 熱傷, 急性膵炎などの非感染性侵襲により sepsis と同様の全身性炎症を呈する病態が認識され, これらを含めた広い症候群として

慶應義塾大学医学部・救急医学教室 *教授 **専任講師

II. SIRS の診断基準

侵襲に対する全身性炎症を反映する4項目; 体温(発熱または低体温), 心拍数(頻脈), 呼吸数(頻呼吸)あるいは PaCO₂低下, 末梢白血球数(白血球増多または減少)あるいは白血球分画(未熟顆粒球増加)のうち2項目以上に異常があれば SIRS とする¹⁾。sepsis の診断基準も SIRS と同一で, 感染症による SIRS を sepsis とした。診断基準の詳細と関連病態の定義とを表1に示した。

III. sepsis と敗血症の乖離

以上に述べた sepsis の定義によれば, 感染症で SIRS となれば sepsis であり, 血中に病原微生物が存在しなくても「sepsis」とされる(図1)。例えば, 壊疽性虫垂炎で38℃以上の発熱と白血球数1,200/mm³以上があれば, 血液培養が陽性でなくとも sepsis とされる。

一方, 邦語の「敗血症」は, 一般に「重症の全身症状を伴う菌血症(あるいは真菌血症)」と定義されている⁴⁾。対応する英語の病態は sepsis より septicemia に近い。とくに内科領域や感染症領域で「敗血症」というには, 血液培養陽性が必要であ

表1 SIRSの診断基準とセプシス関連病態の定義

<p>1. SIRSの診断基準 侵襲に対する全身性炎症性反応で、以下の2項目以上が該当するときSIRSと診断する。 (1) 体温>38℃または<36℃ (2) 心拍数>90/分 (3) 呼吸数>20/分またはPaCO₂: <32Torr (4) 白血球数>12,000/mm³または<4,000/mm³あるいは未熟顆粒球>10%</p> <p>2. セプシス*の定義 感染に対する全身性炎症性反応で、上記の、SIRSと同一の診断基準を満足するもの。 すなわち、セプシスは感染によるSIRSと定義される。</p> <p>3. 重症セプシス*の定義 臓器機能障害・循環不全(乳酸アシドーシス、乏尿、急性意識障害、など)あるいは血圧低下(収縮期血圧<90mmHgまたは平時の収縮期血圧より40mmHg以上の血圧低下)を合併するsepsis。</p> <p>4. 感染性ショック*(septic shock)の定義 重症セプシスの一分症(subset)。適切な補液でも血圧低下(収縮期血圧<90mmHgまたは平時の収縮期血圧より40mmHg以上の血圧低下)が持続する状態で、sepsisに合併するもの。血管作働薬使用により血圧が維持されている場合でも、臓器機能障害・循環不全(乳酸アシドーシス、乏尿、急性意識障害など)があれば、感染性ショックとする。</p>

(ACCP/SCCM Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Chest 101: 1644-1655, 1992より抜粋邦訳)

*ACCP/SCCM Consensus Conferenceの「sepsis」の定義は従来の邦語の「敗血症」とは異なるため、「sepsis」を「敗血症」と訳さないで、あえて「セプシス」、「感染性ショック」を用いた(本文参照)。

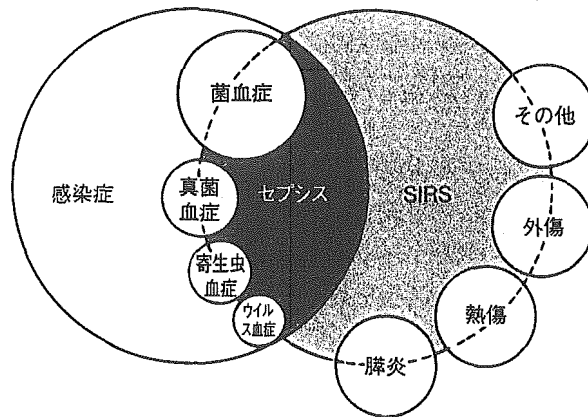


図1 感染症とセプシス(sepsis), SIRSの相互関係

(ACCP/SCCM Consensus Conference Committee¹⁾, 1992年)

ACCP/SCCM Consensus Conference Committeeの「sepsis」の定義は従来の邦語の「敗血症」とは異なるため、あえて「セプシス」と訳した(本文参照)。

り、抗菌薬の「敗血症」適応取得にも、血中分離菌の推移が検討された症例が求められる⁵⁾。

したがって、SIRSから定義される「sepsis」と邦語の「敗血症」との間には乖離があり、sepsisを敗血症と訳してしまうと、大きな混乱が生じる。そこで、筆者は1992年以降の欧米の定義によるsepsisは「セプシス」として、「敗血症」と区別する

べきであると主張している⁵⁾⁶⁾。

IV. SIRSの病態

外傷や病原菌侵入などの侵襲に対する生体反応は、闘争、逃避、止血、循環血液量維持、創修復、感染防御、エネルギー確保など、個体の生存に必

要な反応である。これらの生体反応には、視床下部・交感神経・副腎髄質系(カテコラミン), 視床下部・下垂体・副腎皮質系(CRH, ACTH, コルチゾール, アルドステロン), 視床下部・下垂体前葉系(成長ホルモン, エンドルフィン), 視床下部・下垂体後葉系(バゾプレッシン), 腎・副腎皮質系(レニン, アンギオテンシン, アルドステロン), 膵臓(インスリン, グルカゴン)などの, 神経・内分泌系反応(neuroendocrine responses)が知られている。

さらに侵襲に対する別の反応機構として, 血液凝固線溶系, 補体系, 免疫系などがさまざまに活性化され, その活性化産物がさらに種々の急性期反応を惹起することが知られてきた⁷⁸⁾。SIRS 発生機序には, これらの生体反応機構が複雑に関与しているが, 特に重要なのは, 種々の侵襲刺激により細胞が産生するサイトカインとその他のメジエーターが関与する急性炎症反応である。また, 重症の SIRS, とくに重症セプシスにはしばしば DIC が合併する⁹⁾。

病態の詳細は割愛するが, SIRS では侵襲に対して炎症性サイトカインである TNF- α (tumor necrosis factor- α ; 腫瘍壊死因子) と IL-1 (interleukin-1) の産生が増加し, これらが全身的に作用して, 他のサイトカインやメジエーターの産生を誘導, 全身性炎症反応のカスケードが広まる。侵襲が持続する難治性感染症や, 手術, 外傷に続く感染のような繰返す侵襲(two-hit)では, 炎症性サイトカインの誘導・産生の制御機構が破綻し, 種々のサイトカインが血中に高濃度出現,

重症セプシスや MODS となる。このような状態を, 筆者はサイトカイン・ストームと称している⁷⁾¹⁰⁾。

V. SIRS の臨床的意義

体温, 心拍数, 呼吸数(あるいは PaCO₂), 白血球数(未熟顆粒球百分率)の 4 項目から, 臨床現場で簡便かつ迅速に診断をすることが可能な SIRS は, 患者の重症度判定に役立つ¹¹⁾。

また, リコンビナントヒト活性化プロテイン C など, セプシスや感染性ショックに対する新規薬物療法の治験において SIRS が選択基準として広く用いられるようになった¹²⁾。わが国で昨年認可された好中球エラスターゼ阻害薬の適応にも SIRS の基準が用いられている。

さらに, SIRS 診断基準が簡便であるため, SIRS や sepsis の retrospective study において, きわめて有用な診断基準となっている¹³⁾。集中治療を要する患者や重症感染症患者では, 4 項目はほぼ毎日のように記録されており, retrospective study であっても, データ欠損による診断不能症例はほとんどなくなる。

このように, SIRS は急性炎症による重症患者を把握するには, きわめて有用な疾患概念であるが, ときに SIRS 提唱の背景や SIRS の病態を考慮せずに, 診断基準をあてはめるのみで研究対象を選択するという発表も見受けられる。

SIRS の疾患概念が一人歩きしないよう, 注意も必要である。

文 献

- 1) ACCP/SCCM Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101: 1644-1655, 1992.
- 2) 相川直樹: SIRS・ショック・MODS の歴史的概観. SIRS・ショック・MODS(相川直樹, 青木克憲, 編), pp2-10, 医学書院, 東京, 2001.
- 3) 相川直樹, 浅山圭世: SIRS の概念・定義と提唱の背景. *救急医学* 20: 1003-1007, 1996.
- 4) 齊藤 厚: 敗血症・菌血症. 最新内科学大系, 第27巻, (細菌感染症, 井村裕夫, ほか編), pp69-84, 中山書店, 東京, 1994.
- 5) 相川直樹, 青木克憲, 堀進 悟, ほか: 敗血症の定義とプラクティス・ガイドライン. *化学療法* の領域 18(s-1): 150-154, 2002.
- 6) 相川直樹: SIRS と敗血症. *集中治療医学*, (日本集中治療医学会編), pp331-34, 秀潤社, 東京

- 2001.
- 7) 相川直樹：サイトカイン・ストームと多臓器不全. 日本外科学会雑誌 97：771-777, 1996.
 - 8) 相川直樹, 青木克憲, 藤島清太郎, ほか：血液凝固障害からみた SIRS の病態と治療. 化学療法の領域 18：971-976, 2002.
 - 9) Gando S, Kameue T, Nanzaki S, et al：Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome. *Thromb Haemos* 75：224-228, 1996.
 - 10) Aikawa N, Fujishima S, Sasaki J：Cytokine storm in extensive burns：mechanisms and pharmacological modulation of cytokine-induced systemic inflammation. *Dialysis Transplant Burn* 14：1-6, 2003.
 - 11) Sun D, Aikawa N：The natural history of the systemic inflammatory response syndrome and the evolution of SIRS as a predictor of severity in patients hospitalized through emergency services. *Keio J Med* 48：28-37, 1999.
 - 12) Bernard GR, Vincent JL, Lattiere PF, et al：Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344：699-709, 2001.

〈キーワード〉 SIRS sepsis 敗血症 サイトカインストーム

Oxygenation of hypoxic region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes

Koichi Kobayashi,¹ Teruyuki Komatsu,² Arifumi Iwamaru,¹ Yasuko Matsukawa,² Hirohisa Horinouchi,¹ Masazumi Watanabe,¹ Eishun Tsuchida²

¹Department of General Thoracic Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan

²Department of Polymer Chemistry Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, Tokyo 169-8555, Japan

Received 21 January 2002; revised 25 February 2002; accepted 4 March 2002

Abstract: Recombinant human serum albumin incorporating synthetic heme (rHSA-FeP) was tested for its ability to increase O₂ tension in the hypoxia of the solid tumor rat model. By the direct administration of the rHSA-FeP solution (10 mL/kg) via the aorta descendens to the ascites hepatoma LY80 tumor on the right femur, the O₂ tension of the hypoxic region immediately increased to 3.45 ± 1.43 Torr, which corresponds to a 2.4-fold increase compared to that of the baseline value. These high O₂ levels continued for 300 s

after the infusion. The rHSA-FeP solution can be utilized not only as a red blood cell substitute but also as an O₂-carrying medicine for the effective reoxygenation of the hypoxia solid tumor. © 2002 Wiley Periodicals Inc. *J Biomed Mater Res* 64A: 48–51, 2003

Key words: human serum albumin; synthetic heme; hypoxia; solid tumor; oxygen-carrying medicine

INTRODUCTION

Solid tumors have been found to be highly heterogeneous in oxygenation and to contain hypoxic regions.¹ The classic hypoxia model is that of chronic hypoxia, which develops by uncontrolled cell proliferation within malignant tumors. Cells beyond the diffusion limit of O₂ (≤150 μm) from blood vessels therefore become anoxic and necrotic. On the other hand, acute hypoxia occurs as a result of transient stoppages in microvessel flow. The existing O₂ and other nutrients are rapidly exhausted, thereby leaving the cells in a temporary hypoxic state. These hypoxias are frequently resistant to radiation therapy and chemotherapeutic agents.¹ In fact, two or three radiation

doses are required to kill them compared to the same cells in the fully oxygenated state.^{1–3} However, even if a cancer patient is kept under a hyperbaric O₂ state, the tumor inside is not easily reoxygenated.⁴ Consequently, several trials to oxygenate the hypoxic regions of tumors via artificial O₂ carriers with smaller diameters relative to an erythrocyte have been used since the 1980s. Kokunai and Kuwamura reported that the intravenous administration of a perfluorochemical emulsion to the 9L rat brain tumor model under O₂ respiration increased the tumor O₂ tension.⁵ Other groups also clarified the effects of dose and scheduling on the growth delay of the cancers using perfluorochemicals.^{6,7} More recently, Lindberg et al. performed systematic experiments to evaluate three types of Hb-based compounds—polyethylene glycol conjugated hemoglobin (PEG-Hb), stroma-free Hb, and cross-linked Hb—intravenously injected into the solid tumor models.⁸ In contrast to the negative effect of the stroma-free Hb, the PEG-Hb solution caused a gradual rise in 9L gliosarcoma O₂ pressure, probably due to the fact that the PEG-Hb molecule circulates for a longer time in the bloodstream compared to the other compounds, because of its high molecular weight. Unfortunately, it remained one concern that the high col-

Correspondence to: Eishun Tsuchida; e-mail: eishun@mn.waseda.ac.jp

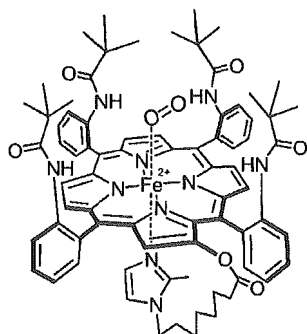
Contract grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan

Contract grant sponsor: Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan; Health Science Research Grants (Artificial Blood Project)

© 2002 Wiley Periodicals, Inc.

loidal osmotic pressure of the PEG-Hb solution might elevate the blood flow and induce increased O₂ tension in the hypoxic cells. Hahn et al. showed that an intravenous infusion of stroma-free Hb into the R3230Ac breast cancer rat model decreased its O₂ tension.⁹ The Hb molecule presumably reduced the blood flow and the O₂ partial pressure through vasoconstriction of the arterioles supplying the tumor. Thus, we emphasize that the intravenous administration of artificial O₂ carriers does not always contribute to a rise in a tumor O₂ tension. Besides the suitable molecular design of the compound, the O₂ carrier should be injected directly into the tumor tissue, which will provide significantly greater efficacy.

We have recently found that the recombinant human serum albumin (rHSA) incorporating a synthetic heme with a covalently linked proximal base, 2-[8-(2-methyl-1-imidazolyl)octanoyloxymethyl]-5,10,15,20-tetrakis[$\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -*o*-pivaloylamino]phenyl]porphinatoiron(II) (FeP, Scheme 1) [rHSA-FeP], can reversibly bind and release O₂ under physiologic conditions (in aqueous media, pH 7.3, 37°C) similar to Hb and myoglobin.^{10,11} The exchange transfusion test with hemorrhagic shocked rats demonstrated that the rHSA-FeP solution satisfies the initial clinical requirements for an O₂ carrying resuscitative fluid.¹² The most remarkable advantage of rHSA-FeP is not to induce an unfavorable hypertensive action due to the nitric oxide (NO) quenching, because it cannot extravasate through the vascular endothelium given the electrostatic repulsion between the albumin surface and glomerular basement membrane.¹³ The entirely synthetic rHSA-FeP is now recognized to be a promising material as a new class of red blood cell substitutes. In this study, rHSA-FeP was tested for its ability to oxygenate the hypoxic region associated with the ascites hepatoma LY80 rat solid tumor.



Scheme 1. Structure of synthetic heme with a covalently linked proximal base, which is incorporated into recombinant human serum albumin: 2-[8-(2-methyl-1-imidazolyl)octanoyloxymethyl]-5,10,15,20-tetrakis[$\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -*o*-pivalamido]phenyl]porphinatoiron(II).

MATERIALS AND METHODS

Preparation

A rHSA (25 wt %) was obtained from the Mitsubishi Wel-Pharma Corporation (Osaka, Japan), and FeP was synthesized as previously reported.¹⁴ The rHSA-FeP solution [FeP/rHSA: 4 (mol/mol); rHSA: 5 g/dL in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3] was prepared according to our previously reported procedure.¹¹ The O₂ binding affinity ($P_{1/2}$) of rHSA-FeP was 30 Torr at 37°C. Prior to administration, the rHSA-FeP solutions kept at 4°C were warmed to room temperature and then saturated with O₂ by flowing O₂ gas, with gentle shaking for 15 min.

Animal tumor models

The ascites hepatoma LY80 cells, a gift from K. Hori, Tohoku University, Japan, were first implanted in the abdominal cavities of donor Donryu rats (male) and allowed to grow for 7 days. The grown tumor LY80 cells (approximately 5×10^6 , 0.05 mL) were subcutaneously transplanted into the right femur of male Donryu rats (Crj-Donryu, about 200 g, 6 weeks old; Nippon Charles River, Yokohama, Japan) with a syringe (25-gauge needle). After tumor implantation, the animals were provided continuous access to food and water.

Tumor surface tissue oxygen measurements

The surface tissue O₂ tension was measured by the O₂ dependence quenching of phosphorescence using Oxyspot phosphorimeter systems (Medical Systems Corp., NY, USA). The O₂ probe 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphinatoparadium, provided as a lyophilized powder containing a 9% probe, 80% bovine serum albumin (BSA) (clinical grade, low fatty acid), 3% Trisma buffer, and 8% NaCl, was dissolved in distilled water (pH 7.4, 0.1 g/mL) and administered intravenously through the tail vein (0.9 mL/kg) for light guide measurements.

Animals were first anesthetized with diethylether and connected to the respirator (Model SN 480-7, Shinano Seisakusho, Tokyo, Japan, 80 times/min). One percent halothane O₂ gas (Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) was pumped via a Small Animal Anesthetizer to keep the anesthesia level constant. The right jugular vein was reversely cannulated, and a polyethylene catheter (SP-10, outer 0.61 mm ϕ , inner 0.28 mm ϕ) was placed in the aorta descendens less than 5 mm above the furcation of the right and left common iliac arteries for sample infusion. The skin overlying the tumor was resected (about 20 mm diameter), and the surface was always kept moist with saline during the measurement. When the preparation of the animals was complete, the O₂ probe was slowly injected via the tail vein (vide infra). After the baseline tissue O₂ was measured under respiration with room air or 99% oxygen, the O₂-

saturated rHSA-FeP solution (10 mL/kg) was intravenously administered via the jugular vein with a syringe pump (FP-W-100, Matys, Toyo Sangyo Co., Ltd., Toyama, Japan) (2.5 mL/kg/min, $n = 4$). The O_2 tension of the tumor area was then remeasured at various times at 30 s intervals postinjection for 900 s. The measurements were carried out five times in each step, and all data were expressed in averaged values \pm standard error (SE). During the administration, no remarkable acute reaction was seen in the appearance of the rats. The light from a flash-lamp filtered through an interference filter with a 545 nm center wavelength, and a half-bandwidth of 45 nm was conducted through the light guide and focused on an approximately 10-mm diameter area of the tissue, from 5 mm above the skin surface. On the other hand, the phosphorescence collected by the lens introduced into the light guide was filtered through a long pass filter at 645 nm and led into the photomultiplier. The phosphorescence decay was fitted to a single exponential to determine the lifetime and O_2 partial pressure using the Stern-Volmer equation. The O_2 -saturated rHSA solution (5 g/dL) was also applied to the similarly treated rats for the reference group (10 mL/kg, $n = 4$).

The data were analyzed with an analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test between the groups. The rats were sacrificed at the end of the experiments by pentobarbital overdose to confirm the position of the catheter top in the descent aorta.

The experimental protocol was fully approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of Keio University, School of Medicine. The care and handling of the animals were in accordance with the NIH guidelines.

RESULTS AND DISCUSSION

The diameter of the ascites hepatoma LY80 tumor on the right femur increased $18 \times 14 \text{ mm} \phi 8$ days after the implantation. The systemic arterial P_{O_2} level was kept at approximately 400 Torr under a 99% O_2 respiration, and there were no differences in the basal values of each measurement between the rHSA-FeP and rHSA groups (Table I). The top of the catheter in the aorta descendens was always placed within 0–2.5 mm above the furcation of the common iliac arteries,

TABLE I
Basal Values of the Various Parameters in rHSA-FeP and rHSA Groups ($n = 4$)

	rHSA-FeP	rHSA
Weight (g)	213 \pm 4.2	203 \pm 6.3
Tumor size (mm)	16.5 \times 14.0	19.0 \times 14.0
P_{O_2} (tumor tissue)	1.4 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2
P_{O_2} (normal tissue)	15.7 \pm 2.3	14.8 \pm 2.8
Blood gas parameters		
pH	7.41 \pm 0.04	7.42 \pm 0.04
P_{O_2} (Torr)	394 \pm 73	402 \pm 60
P_{CO_2} (Torr)	34.6 \pm 4.2	33.0 \pm 2.8

Mean value \pm standard error.

which was confirmed by the abdominal operation after the experiments. The O_2 tension of the tumor tissue (1.4–1.7 Torr) was obviously low compared to that of the normal tissue (15–16 Torr).

After the administration of the O_2 -saturated rHSA (5 wt %, 10 mL/kg), only a negligibly small change in the tumor O_2 tension was observed (Fig. 1). The small difference from the baseline remained constant during the monitoring period. The response is exactly the same as that observed following infusion with an equivalent volume of saline in this experimental setup (results not shown). In contrast, the administration of the O_2 -saturated rHSA-FeP solution significantly increased the tumor O_2 tension up to 3.45 ± 1.43 Torr, which corresponds to a 2.4-fold increase compared to that of the baseline value. However, just after the injection of rHSA-FeP, slight decreases in the P_{O_2} were observed ($\Delta P_{O_2} = \text{ca. } -0.7$ Torr). This small negative response was probably related to the acute reaction of rHSA-FeP to terminal arterioles in the tumor tissue, and then the vasculature resistance was somewhat changed. The high P_{O_2} levels continued for 300 s, followed by a graduated decrease throughout the observation period. From these results, we can conclude that the rHSA-FeP molecule penetrates the abnormal tumor microvasculature where erythrocytes cannot traverse and delivers O_2 to the hypoxic cells in the solid tumor. Although the exact circulation half-life of rHSA-FeP is unknown in this model (it should be over 4 h, based on our previous exchange transfusion test with anesthetized rats), the rHSA-FeP was not detected in either the urine or any body fluids during the measurements. The returning of the P_{O_2} level to the

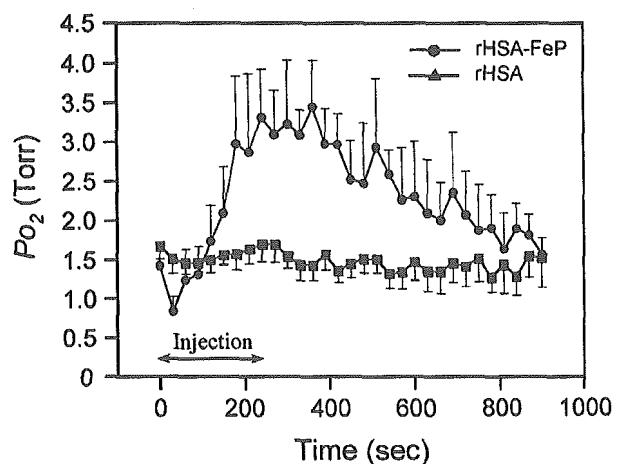


Figure 1. Changes in the O_2 tension of the hypoxic region of the ascites hepatoma LY80 solid tumor after the administration of the O_2 -saturated rHSA-FeP or rHSA solutions in the anesthetized rats (significant difference from baseline: $p < 0.05$) ($n = 4$ each). All data are shown as changes from the basal values (P_{O_2}) just before the infusion and expressed as mean \pm standard error.

baseline suggests that rHSA-FeP diffuses into the blood circulation and distributes in the whole body.

The increased amount of the tumor O₂ tension after the administration of the artificial O₂ carrier is affected by responses against blood vessels, which are influenced by the differences in the molecular weight, particle diameter, solution property, and O₂ binding affinity of the material. In fact, unmodified cell-free Hb solutions are not suitable for tumor reoxygenation agents because of their rapid renal excretion and acute vasoconstriction.^{8,9} Therefore, several researchers have designed a large molecular-size PEG-Hb and applied it to the tumor models.^{8,15} By virtue of the increased molecular weight, the extravasation is reasonably attenuated, but the delivery of O₂ to hypoxic tumors showed limited improvement (e.g., only 78% up). Moreover, its high viscosity and colloid osmotic pressure should influence the plasma volume, and share stress on the capillary wall. In contrast, our albumin-based synthetic O₂ carrier has several advantages. First, although the molecular size of the albumin vehicle is as small as that of Hb, it does not rapidly escape via renal filtration.¹³ The solution properties (e.g., viscosity and surface net charges) of rHSA-FeP are completely identical to those of the natural plasma albumin.^{10,11} Second, the O₂ binding characteristics of rHSA-FeP can be easily controlled. In order to supply sufficient quantitative O₂ to a hypoxic tumor, it is necessary to adjust the O₂ binding affinity to a high level (low $P_{1/2}$). The injected rHSA-FeP with a high O₂ binding affinity should remain loaded during passage through the arteries and arterioles where the P_{O_2} is relatively high, and then selectively release a large amount of O₂ to the hypoxia in the solid tumor. This idea that the O₂ carrier with high O₂ binding affinity more effectively oxygenates hypoxic tissues is supported by other studies.^{8,16} Recently, a new rHSA-FeP with high O₂ binding affinity ($P_{1/2}$: 1 Torr) has also been synthesized by tuning the chemical structure of the incorporated heme.¹⁷ Use of this rHSA-FeP solution will efficiently increase the tumor O₂ tension. We can set up the most suitable performance of rHSA-FeP for formation types of tumors and occurrence regions. Third, furthermore, rHSA is now manufactured on a million-vials scale by expression with the methylotropic yeast *Pichia pastoris* as a host cell, and will reach the market within a few years.¹⁸

There are still some unclarified points concerning the functions of the tumor vasculature. Although more research is required to consider how rHSA-FeP behaves in the tumor blood vessel and is related to the increase in the O₂ partial pressure, the present results obviously indicate that the albumin-based O₂ carrier led to an excessive O₂ release in the hypoxic region in the solid tumor. Experiments of a combined therapy with the rHSA-FeP administration and various cancer therapeutics (radiation therapy, carcinostatics treatment) are now under way.

References

1. Coleman CN. Hypoxia in tumor: A paradigm for the approach to biochemical and physiologic heterogeneity. *J Nat Cancer Inst* 1988;80:310-317, and references therein.
2. Brown JM, Yu NY. Radiosensitization of hypoxic cells *in vivo* by SR 2508 at low radiation dose. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984;10:1207-1212.
3. Skarsgard LD, Harrison I, Durand RE, Palcic B. Radiosensitization of hypoxic cells at low dose. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:1075-1078.
4. Dische S. Radiotherapy—new fractionation schemes. *Sem Oncol* 1994;21:304-310.
5. Kokunai T, Kuwamura K. Effect of perfluorochemicals on BCNU chemotherapy: Preliminary study in a rat brain tumor model. *Surg Neurol* 1982;18:258-261.
6. Teicher BA, Rose CM. Effects of dose and scheduling on growth delay of the Lewis lung carcinoma produced by the perfluorochemical emulsion, fluosol-DA. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:1311-1313.
7. Rockwell S. Perfluorocarbon emulsions and radiation therapy. *Biomater Artif Cell Im* 1994;22:1097-1108.
8. Lindberg R, Conover CD, Shum KL, Shorr RGL. Increased tissue oxygenation and enhanced radiation sensitivity of solid tumors in rodents following polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin administration. *In Vivo* 1998;12:167-174.
9. Hahn JS, Braun RD, Dewhirst MW, Shan S, Snyder SA, Taube JM, Ong ET, Rosner GL, Dodge RK, Bonaventura JB, Bonaventura C, De Angelo J, Meyer RE. Stroma-free human hemoglobin A decreases R3230Ac rat mammary adenocarcinoma blood flow and oxygen partial pressure. *Radiat Res* 1997;147:185-194.
10. Komatsu T, Hamamatsu K, Wu J, Tsuchida E. Physicochemical properties and O₂-coordination structure of human serum albumin incorporating tetrakis(*o*-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) derivatives. *Bioconjugate Chem* 1999;10:82-86.
11. Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Hamamatsu K, Wu J. Human serum albumin incorporating tetrakis(*o*-pivalamido)phenylporphyrinato-iron(II) derivative as a totally synthetic O₂-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* 1999;10:797-802.
12. Tsuchida E, Komatsu T, Hamamatsu K, Matsukawa Y, Tajima A, Yoshizu A, Izumi Y, Kobayashi K. Exchange transfusion with albumin-heme as an artificial O₂-infusion into anesthetized rats: Physiological responses, O₂-delivery, and reduction of the oxidized heme sites by red blood cells. *Bioconjugate Chem* 2000;11:46-50.
13. Komatsu T, Matsukawa Y, Sakai H, Nakagawa A, Kobayashi K, Suematsu M, Tsuchida E. Human serum albumin incorporating synthetic heme: Red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res*. Forthcoming.
14. Tsuchida E, Komatsu T, Kumamoto S, Ando K, Nishide H. Synthesis and O₂-binding properties of tetraphenylporphyrinato-iron(II) derivatives bearing a proximal imidazole covalently bound at the β -pyrrolic position. *J Chem Soc Parkin Trans* 1995;747-753.
15. Teicher BA, Ara G, Chen Y-N, Emi Y, Kakeji Y, Ikebe M, Mehara Y. PEG-hemoglobin: Effects on tumor oxygenation and radiosensitization. *Rad Oncol Inv* 1996;4:200-210.
16. Stein JC, Ellsworth ML. Capillary oxygen transport during severe hypoxia: Role of hemoglobin oxygen affinity. *J Appl Physiol* 1993;75:1601-1607.
17. Komatsu T, Okada T, Moritake M, Tsuchida E. O₂-binding properties of double-sided porphyrinatoiron(II)s with polar substituents and their human serum albumin hybrids. *Bull Chem Soc Jpn* 2001;74:1695-1702.
18. Sumi A, Ohtani W, Kobayashi K, Ohmura T, Yokoyama K, Nishida M, Suyama T. Purification and physicochemical properties of recombinant human serum albumin. In: Rivat C, Stoltz J-F, editors. *Biotechnology of blood proteins*, Vol. 227. Montreux: John Libbey Eurotext; 1993. p 293-298.