

were not significantly different between the 2 groups (SA: $125 \pm 57\%$, UA: $103 \pm 35\%$).

Discussion

Monocyte-macrophages have been reported to play a key role in the pathogenesis of atherosclerosis and microorganisms such as *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus have been found to aggravate atherosclerosis by activating immune systems in the host. Further, toll-like receptors have been shown to be the receptors

by which innate immunity cells recognize invading microorganisms.

Among the 10 TLRs identified, TLR4 is the best characterized. Although TLR4 was identified as a receptor for the LPS of gram-negative bacteria, it also has been reported to be a receptor of endogenous ligands such as fibrinogen (23) and heat-shock protein 60 (24). Since levels of these endogenous ligands are known to be elevated in subjects with atherosclerosis (25), TLR4 is thought to play a crucial role in activating monocyte-macrophages in atherosclerosis.

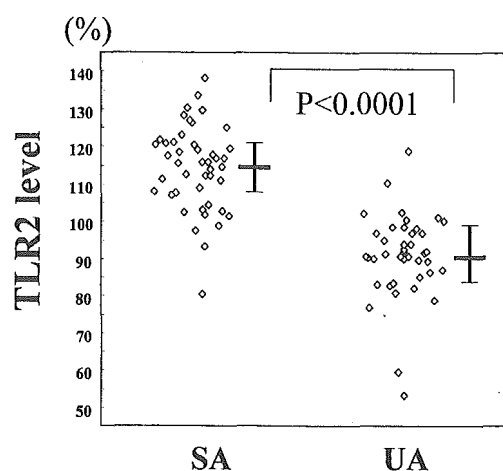


Fig. 4. Effect of LPS stimulation on TLR2 levels in SA and UA patients expression levels of TLR2 of LPS stimulated monocytes of patients with SA and UA are shown as normalized expression levels. The bar plots show medians in the 25th and 75th percentiles.

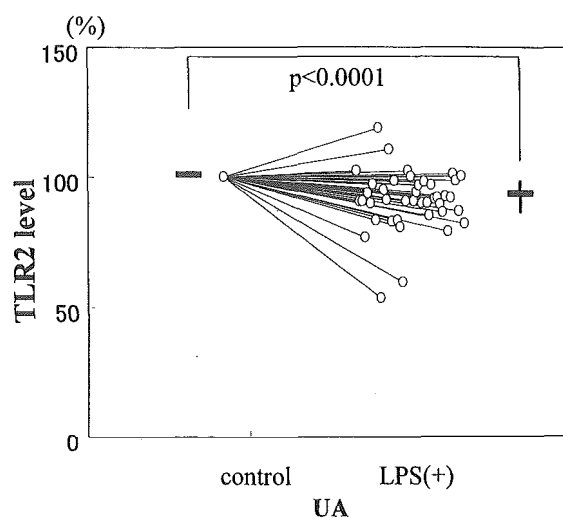


Fig. 6. Effect of LPS stimulation on TLR2 expression levels in UA patients.

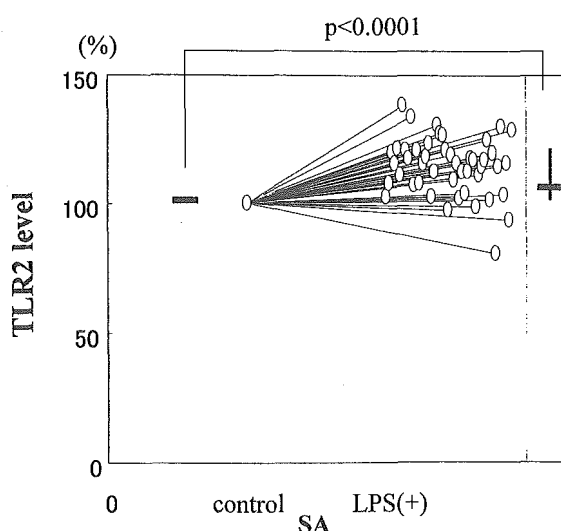


Fig. 5. Effect of LPS stimulation on TLR2 expression levels in SA patients.

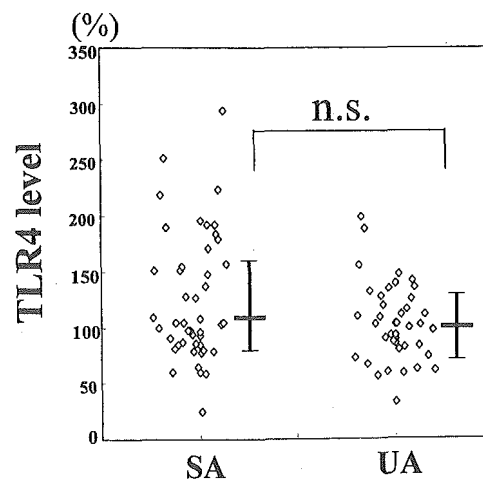


Fig. 7. Effect of LPS stimulation on TLR4 Levels in SA and UA Patients TLR4 expression levels of LPS stimulated monocytes of patients with SA and UA are shown as normalized expression levels. The bar plots show medians in the 25th and 75th percentiles.

TLR2 was identified as a receptor for the peptidoglycan of gram-positive bacteria. Although no endogenous ligand of TLR2 has been found so far, it has been reported that, in endothelial cells (20) and macrophages (21), TLR2 is induced by TLR4 stimulation, thereby sensitizing cells to TLR2 ligands. As TLR4 and TLR2 have a common downstream signaling pathway, which leads to NF- κ B activation, the cross-talk between TLR4 and TLR2 works as a positive feedback loop. Recently, Fan *et al.* have demonstrated that after intraperitoneal infection of wild type or TLR2 knockout mice by *E. coli*, the absence of TLR2 induction in the TLR2 knockout mice resulted in reduced expression levels of ICAM-1, and subsequently reduced migration of polymorph nuclear neutrophils into the lung (19). These findings suggest that TLR4 and TLR2 do not merely sense the specific ligands individually but rather act in concert to protect the host from infection (18).

Regarding the role of TLR4 and TLR2 in the pathogenesis of atherosclerosis, Edfeldt *et al.* reported that in human atherosclerotic plaques, TLR4 and TLR2 were expressed on macrophages invading atherosclerotic plaques and their immunoreactivities were co-localized with the nuclear translocation of NF- κ B, a marker of the activation of this pathway, suggesting that TLR4 and TLR2 could play an important role in macrophage activation in such plaques (11).

In the present study, we demonstrated that expression levels of TLR4 and TLR2 on circulating monocytes are changed in CAD patients. We also found that the cross talk between TLR4 and TLR2 was differentially regulated in SA and UA patients. Thus the major findings of our study are as follows: 1) The expression levels of TLR4 on circulating monocytes were higher in SA and UA patients than in CNT patients and were not significantly different between the SA and UA patients. 2) The expression levels of TLR2 on circulating monocytes were higher in UA patients than in SA and CNT patients, and levels were not significantly different between the SA and CNT patients. 3) The response of TLR2 levels to LPS stimulation was differentially regulated in the SA and UA patients with up-regulation in SA patients and down-regulation in UA patients.

Expression levels of TLR4 in SA and UA patients

Our study showed that TLR4 levels were increased in both SA and UA patients. In human monocytes, increased surface expression of TLR4 by INF- γ has been reported to be associated with enhanced activation of the NF- κ B pathway and subsequent production of inflammatory cytokines in response to LPS stimulation (26). Also, low serum levels of LPS have been detected in healthy subjects and shown to be an independent risk factor for atherosclerosis (27) and at low concentration ranges, LPS has been found to have significant proinflammatory ef-

fects on human blood vessels (28).

In subjects with carotid atherosclerosis, it was noted that serum levels of HSP 60, an endogenous ligand for TLR4, were also increased and there was a significant correlation between this and intima-media thickness (25). Another study found that serum levels of fibrinogen, another endogenous ligand for TLR4, were increased in patients with acute coronary syndrome (29). Taken together, these findings suggest that increased levels of TLR4 on circulating monocytes play an important role in the development of coronary plaques in CAD patients.

Expression levels of TLR2 in UA patients

In the present study, TLR2 levels were increased only in UA patients. Matsuguchi *et al.* (21) reported that in mouse macrophages, TLR4 messenger RNA was constitutively expressed and expression stayed at a constant level after stimulation with LPS or proinflammatory cytokines. On the other hand, TLR2 messenger RNA was expressed at low levels in the absence of stimulation but rose to high levels when cells were stimulated with either LPS or proinflammatory cytokines. Such LPS-mediated TLR2 messenger RNA induction was brought to an end by the blockade from NF- κ B activation, suggesting that the NF- κ B pathway plays an essential role in this regard.

Ritchie *et al.* (30) reported that the activation level of the NF- κ B pathway, as indicated by the DNA binding of NF- κ B in PBMCs, was much higher in UA patients than in SA patients. UA has also been reported to be associated with an inflammatory response, not only at the site of plaque rupture but also in the systemic circulation, as shown by increased plasma levels of CRP and proinflammatory cytokines (31) as well as by the activation of circulating monocytes (32, 33) and CD4-positive T lymphocytes (34). In these studies, the inflammatory marker levels were shown to be higher in UA than in SA patients. In our study, both activation of the NF- κ B pathway in monocytes and increased levels of proinflammatory cytokines could explain the increased level of TLR2 expression on peripheral monocytes observed in the UA patients.

Cross talk between TLR4 and TLR2 in SA and UA patients

The cross talk between TLR4 and TLR2 was differentially regulated in the SA and UA patients. In the SA patients, TLR2 levels were increased by TLR4 stimulation with LPS, as previously reported for mouse macrophages and human endothelial cells. In contrast, in the UA patients, in which basal TLR2 levels were elevated, TLR2 levels were decreased by LPS stimulation. Given that the increased TLR2 levels on monocytes due to TLR4 stimulation works as a positive feedback loop, the decrease in TLR2 levels due to TLR4 stimulation in the UA patients

could have a protective role against excess stimuli. This response involving the TLR2 expression level is similar to that seen in activation levels of monocytes derived from UA patients due to LPS stimulation.

In this regard, Zalai *et al.* (33) measured the migration capacity and membrane fluidity of circulating monocytes as indices of their activation levels and showed that at baseline, monocyte activation levels were higher in UA than in SA patients. After LPS stimulation, the migration capacity of monocytes was increased in normal donors, but this was not the case for monocytes isolated from UA patients. The monocytes from the UA patients, however, could have already been activated and resistant to further activation. If the down-regulation of TLR2 levels after LPS stimulation has a protective role against excess stimuli, the elucidation of the mechanism of this regulation could lead to the identification of a new therapeutic option for modulating immunity activation levels in patients with CAD.

Study limitations

Our results suggested that the systemic inflammatory response in SA patients was associated with increased TLR4 expression levels on circulating monocytes, while the more prominent systemic inflammatory response in UA patients was associated with increased TLR2 expression levels. However, to confirm these observations, it would be necessary to investigate any changes in the expression pattern of these TLRs in the same patients. It would also be important to determine whether the induction of TLR2 expression is an event preceding plaque rupture or just a consequence of it. These issues should be clarified in future studies.

Conclusions

In the present study on surface expression levels of TLR2 and TLR4 on circulation monocytes in SA and UA patients, we showed that TLR4 levels were increased in both SA and UA patients, while TLR2 levels were increased only in UA patients. With LPS stimulation, the TLR2 levels were up-regulated in the SA patients but down-regulated in the UA patients.

References

- (1) Ross R: Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115–126, 1999
- (2) Libby P, Ridker PM, and Maseri A: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105: 1135–1143, 2002
- (3) Ohsuzu F: The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb*, 11: 313–321, 2004
- (4) Sato T, Takebayashi S, and Kohehi K: Increased subendothelial infiltration of the coronary arteries with monocytes/macrophages in patients with unstable angina. *Atherosclerosis*, 68: 191–197, 1995
- (5) Sasaguri Y and Tanimoto A: Role of macrophage-derived histamine in atherosclerosis - Chronic participation in the inflammatory response - *J Atheroscler Thromb*, 11: 122–130, 2004
- (6) Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, and Yan Z-Q: Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*, 91: 281–291, 2002
- (7) Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1: 135–145, 2001
- (8) Modlin RL, Brightbill HD, and Godowski PJ: The Toll of innate immunity on microbial pathogens. *N Engl J Med*, 340: 1834–1835, 1999
- (9) Akira S, Takeda K, and Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Rev*, 2: 675–680, 2001
- (10) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, and Janeway CA Jr: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388: 394–397, 1997
- (11) Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK and Yan Z-q: Expression of Toll-Like Receptors in Human Atherosclerotic Lesions: A possible Pathway for Plaque Activation. *Circulation*, 105: 1158–1161, 2002
- (12) Xu XH, Shap PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu X-P, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, and Arditi M: Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*, 104: 3103–3108, 2001
- (13) Boekholdt SM, Agema WRP, Peters RJG, Zwinderman AH, van der Wall EE, Reitsma PH, Kastelein JJP, and Jukema JW: Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation*, 107: 2416–2421, 2003
- (14) Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, and Shwartz DA: Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*, 347: 185–192, 2002
- (15) Shah PK: Circulating markers of inflammation for vascular risk prediction; Are they ready for prime time? *Circulation*, 105: 1758–1759, 2000
- (16) Yokota K, Take A, Nakaseko C, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Maezawa Y, Nishimura M, Mori S, and Saito Y: Bone marrow-derived vascular cells in response to injury. *J Atheroscler Thromb*, 10: 205–210, 2003
- (17) Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, and Nihoyannopoulos P: Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*, 100: 793–798, 1999.

- (18) Latz E and Golenbock DT: Receptor "cross talk" in innate immunity. *J Clin Invest*, 112: 1136–1137, 2003
- (19) Fan J, Frey RS and Malik AB: TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest*, 112: 1234–1243, 2003
- (20) Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, and Arditi M: Bacterial lipopolysaccharide and IFN- γ induce toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- κ B activation. *J Immunol*, 166: 2018–2024, 2001
- (21) Matsuguchi T, Musikacharoen T, Ogawa T, and Yoshikai Yasunobu. Gene Expression of Toll-Like Receptor 2, But Not Toll-Like Receptor 4, Is Induced by LPS and Inflammatory Cytokines in Mouse Macrophages. *J Immunology*, 165: 5767–5772, 2000
- (22) Hamm CW, and Braunwald E: A classification of unstable angina revisited. *Circulation*, 102: 118–122, 2000
- (23) Smiley ST, King JA, and Hancock WW: Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through Toll-like receptor 4. *J Immunology*, 167: 2887–2894, 2001
- (24) Ohashi K, Burkart V, Flohe S, and Kolb H: Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J Immunology*, 164: 558–561, 2000
- (25) Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J, Kiechl S, and Wick G: Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation*, 102: 14–20, 2000
- (26) Bosio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, and Muzio M: Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon- γ : a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood*, 99: 3427–3431, 2002
- (27) Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, and Willeit J: Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 34: 1975–1981, 1999
- (28) Rice JB, Stoll LL, Li WG, Denning GM, Weydert J, Charipar E, Richerbacher WE, Miller FJ Jr, and Weintraub NL: Low-level endotoxin induces potent inflammatory activation of human blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 1576–1582, 2003
- (29) Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, and Wallentin L: Prognostic influence of increased Fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. *Circulation*, 96: 4204–4210, 1997
- (30) Ritchie ME: Nuclear Factor- κ B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation*, 98: 1707–1713, 1998
- (31) Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, and Shimada K: Increased levels of monocyte-related cytokines in patients with unstable angina. *Atherosclerosis*, 161: 403–408, 2002
- (32) Jude B, Agraou B, McFadden EP, Susen S, Bauters C, Lepelley P, Vanhaesbroucke C, Devos P, Cosson A, and Asseman P: Evidence for time-dependent activation of monocytes in the circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. *Circulation*, 90: 1662–1668, 1994
- (33) Zalai CV, Kolodziejczyk MD, Pilarski L, Christov A, Nation PN, Lundstrom-Pfugfelder PW, Brown JE, and Lucas A: Increased circulating monocyte activation in patients with unstable coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 38: 1340–1347, 2001
- (34) Neri Serneri GG, Prisko D, Martini F, Gori AM, Burunelli T, Poggesi L, Rostagno C, Gensini GF, and Abbate R: Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation*, 95: 1806–1812, 1997

Associations of plasma C-reactive protein levels with the presence and extent of coronary stenosis in patients with stable coronary artery disease

Hiroaki Taniguchi^a, Yukihiro Momiyama^{a,*}, Reiko Ohmori^a, Atsushi Yonemura^b, Takeshi Yamashita^c, Seiichi Tamai^b, Haruo Nakamura^c, Fumitaka Ohsuzu^a

^a First Department of Internal Medicine, National Defense Medical College, Saitama, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

^b Department of Laboratory Medicine, National Defense Medical College, Saitama, Japan

^c Mitsukoshi Health and Welfare Foundation, Tokyo, Japan

Received 30 December 2003; received in revised form 15 July 2004; accepted 13 August 2004

Available online 27 September 2004

Abstract

Prospective studies showed plasma high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) levels to be a powerful predictor of cardiac events. However, the association between hsCRP levels and the extent of coronary stenosis in patients with coronary artery disease (CAD) remains controversial. We investigated the association between hsCRP levels and the extent of coronary stenosis in 273 patients undergoing elective coronary angiography. Plasma hsCRP levels were higher in patients with CAD than in those without CAD (0.70 mg/l versus 0.56 mg/l, $P < 0.02$), but hsCRP levels did not correlate with the number of $>50\%$ stenotic vessels and were not a significant factor for CAD. However, after the exclusion of 76 patients taking statins, a step-wise increase in hsCRP levels was found depending on the number of $>50\%$ stenotic vessels: 0.50 in CAD(–), 0.68 in 1-vessel, 0.77 in 2-vessel, and 0.88 mg/l in 3-vessel disease ($P < 0.01$). The hsCRP levels also correlated with the numbers of $>50\%$ and $>25\%$ stenotic segments ($r = 0.30$ and 0.32 , $P < 0.001$). Multivariate analysis revealed the hsCRP levels to be a significant factor for CAD. Thus, after the exclusion of patients with statins, plasma hsCRP levels were found to be associated with the presence and extent of coronary stenosis in patients with stable CAD.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Coronary artery disease; C-reactive protein; Statin; Inflammation

1. Introduction

Inflammation has been recognized to play an important role in both the initiation and progression of coronary artery disease (CAD) [1,2]. Several prospective studies [3–5] recently showed that plasma high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) levels, which are one of the markers of systemic inflammation, are a powerful predictor of future myocardial infarction (MI) and cardiac death among appar-

ently healthy individuals. The high hsCRP levels have also been reported to be associated with an increased risk of further coronary events in patients with CAD [6–8]. However, the association between the plasma hsCRP levels and the extent of coronary stenosis in patients with CAD remains controversial. Some studies previously demonstrated such associations [8–10], whereas others could not find [11–15]. We recently reported the median value of the hsCRP levels in 3515 Japanese healthy people to be 0.2 mg/l [16], which seems to be much lower than those reported in other ethnic groups: 1.6 mg/l in Americans [17] and 1.9 mg/l in Turks [18]. However, there has been no report showing the

* Corresponding author. Tel.: +81 42 995 1597; fax: +81 42 996 5200.
E-mail address: momiyama@me.ndmc.ac.jp (Y. Momiyama).

hsCRP levels in Japanese patients with stable CAD. Our study was done to elucidate the association between the plasma hsCRP levels and the extent of coronary stenosis and to also clarify the hsCRP levels of Japanese patients with stable CAD.

2. Methods

2.1. Study patients

We measured the plasma hsCRP levels in 273 consecutive patients (198 male; mean age: 64 ± 8 years, range: 40–85 years) who underwent elective coronary angiography (CAG) for suspected CAD at the National Defense Medical College Hospital from July 1999 to July 2003. The results were compared with the findings of coronary angiograms. Any patients with MI within 6 months, those with unstable angina who had anginal pain at rest within 1 month, or those with a history of percutaneous coronary intervention (PCI) or coronary artery bypass surgery were excluded. Of the 273 patients, 149 (55%) had hypertension (blood pressures of $\geq 160/95$ mmHg or on drugs), and 118 (43%) had hyperlipidemia (total cholesterol level of >240 mg/dl or on drugs), of whom 76 were taking lipid-lowering drugs (statins). Diabetes mellitus (fasting glucose level of ≥ 126 mg/dl or on hypoglycemic drugs or insulin) was present in 77 (28%) patients, and 54 (20%) were smokers (≥ 5 cigarettes/day). Our study was approved by the ethics committee of the hospital. After written informed consent was obtained, blood samples were taken in a fasting state on the morning of the day when angiography was performed. The plasma hsCRP levels were measured using the BNII nephelometer (Dade Behring, Japan). The serum total and HDL cholesterol levels were measured on a Hitachi 7600 analyzer using standard enzymatic methods (Kyowa Medics, Japan). The LDL cholesterol levels were also measured by a direct enzymatic method with a commercially available kit (Cholestest LDL, Daiichi Pure Chemicals, Japan).

2.2. Coronary angiography

Coronary angiograms were recorded by a femoral approach with the Judkins technique using a cineangiogram system (Toshiba, Japan). Coronary angiograms and clinical histories were all evaluated by Y. Momiyama, blinded to the hsCRP data. CAD was defined as at least one coronary artery having $>50\%$ luminal diameter stenosis. The extent of coronary stenosis was represented as the numbers of $>50\%$ stenotic vessels and $>50\%$ and $>25\%$ stenotic segments. Moreover, the degree of stenosis in each segment was scored from 0 to 4 points (0, $\leq 25\%$; 1, 26–50%; 2, 51–75%; 3, 76–90%; 4, $>90\%$ stenosis), and the extent score of coronary stenosis was defined as the sum of the scores of all segments. Coronary artery segments were defined according to the Coronary Artery Surgery Study classification.

2.3. Statistics

Any differences between the two groups were evaluated by the unpaired *t*-test for parametric variables, by the Mann–Whitney *U*-test for nonparametric variables, and by the χ^2 -test for categorical variables. Any differences among the three or more groups were evaluated by the analysis of variance with Scheffe's test for parametric variables, by the Kruskal–Wallis test for nonparametric variables, and by the χ^2 -test for categorical variables. Since the distributions of the measured hsCRP levels and the measured extent of coronary stenosis were highly skewed, the correlations between the plasma hsCRP levels and the extent of coronary stenosis were evaluated by Spearman's rank correlation test. A forward step-wise multiple logistic regression analysis was used to elucidate the association between CAD and the hsCRP levels. A *P* value of <0.05 was considered to be statistically significant. The results are presented as the mean value \pm S.D. or the median value.

3. Results

Of the 273 patients, CAD was found in 175 patients (64%), of whom 72 had 1-vessel disease, 61 had 2-vessel disease, and 42 had 3-vessel disease. Of the 175 patients with CAD, 12 (7%) had a history of MI >6 months ago. Compared with the 98 patients without CAD, the 175 with CAD were predominantly male, had higher rates of hypertension and diabetes and also had lower HDL-cholesterol levels (Table 1). The plasma hsCRP levels were higher in patients with CAD than in those without CAD (median value 0.70 mg/l versus 0.56 mg/l, $P < 0.02$). The hsCRP level of >2.0 mg/l, which we previously reported as the upper limit in healthy Japanese [16], was found in 24% of patients with CAD versus 12% without CAD ($P < 0.05$). The hsCRP levels tended to increase depending on the number of $>50\%$ stenotic vessels: 0.56 mg/l in CAD(–), 0.70 mg/l in 1-vessel, 0.70 mg/l in

Table 1
Clinical characteristics of patients with and without CAD

	CAD (<i>n</i> = 175)	CAD(–) (<i>n</i> = 98)	<i>P</i> value
Age (years)	65 ± 8	63 ± 8	NS
Gender (male)	135 (77%)	63 (64%)	<0.05
Body mass index (kg/m ²)	25 ± 4	24 ± 4	NS
Hypertension	107 (61%)	42 (43%)	<0.01
Systolic BP (mmHg)	138 ± 18	132 ± 17	<0.02
Hyperlipidemia	82 (47%)	36 (37%)	NS
Statins (+)	53 (30%)	23 (23%)	NS
Total cholesterol (mg/dl)	206 ± 35	207 ± 32	NS
LDL-cholesterol (mg/dl)	128 ± 31	124 ± 26	NS
HDL-cholesterol (mg/dl)	49 ± 14	58 ± 17	<0.001
Diabetes mellitus	62 (35%)	15 (15%)	<0.001
Current smoking	37 (21%)	17 (17%)	NS
Plasma hsCRP (mg/l)	0.70	0.56	<0.02
hsCRP >2.0 mg/l	42 (24%)	12 (12%)	<0.05

Data are presented as the mean value \pm S.D. or the number (%) of patients. Plasma hsCRP levels are presented as the median value. BP: blood pressure.

Table 2

Correlations between plasma hsCRP levels and the extent of coronary artery stenosis

	<i>r</i>	<i>P</i> value
All study patients (<i>n</i> = 273)		
The number of >50% stenosis	0.20	<0.002
The number of >25% stenosis	0.23	<0.001
The extent score of stenosis	0.21	<0.002
Patients without statins (<i>n</i> = 197)		
The number of >50% stenosis	0.30	<0.001
The number of >25% stenosis	0.32	<0.001
The extent score of stenosis	0.31	<0.001

2-vessel, and 0.82 mg/l in 3-vessel disease, but the differences among the four groups did not reach statistical significance. The hsCRP levels correlated with the numbers of >50% and >25% stenotic segments ($r = 0.20$ and 0.23) and the extent score of coronary stenosis ($r = 0.21$) ($P < 0.002$) (Table 2). However, in a multivariate analysis, the hsCRP levels were not a significant factor for CAD (Table 3).

Since lipid-lowering drugs (statins) can affect the plasma hsCRP levels [19,20] or may cause the regression of coronary stenosis [21,22], the 76 patients who were taking statins were excluded. After the exclusion of such patients, the hsCRP levels were much higher in patients with CAD than in those without CAD (median 0.79 mg/l versus 0.50 mg/l, $P < 0.001$). The hsCRP level of >2.0 mg/l was found in 24% of patients with CAD versus 5% without CAD ($P < 0.005$). A step-wise increase in the hsCRP levels was found depending on the number of >50% stenotic vessels: 0.50 mg/l in CAD(–), 0.68 mg/l in 1-vessel, 0.77 mg/l in 2-vessel, and 0.88 mg/l in 3-vessel disease ($P < 0.01$) (Fig. 1). The hsCRP levels also correlated better with the numbers of >50% and >25% stenotic segments ($r = 0.30$ and 0.32) and the extent score of coronary stenosis ($r = 0.31$) ($P < 0.001$) (Table 2 and Fig. 2). The multivariate analysis revealed the hsCRP levels to be a significant factor associated with CAD independent of conventional risk factors (Table 3). The odds ratio for the

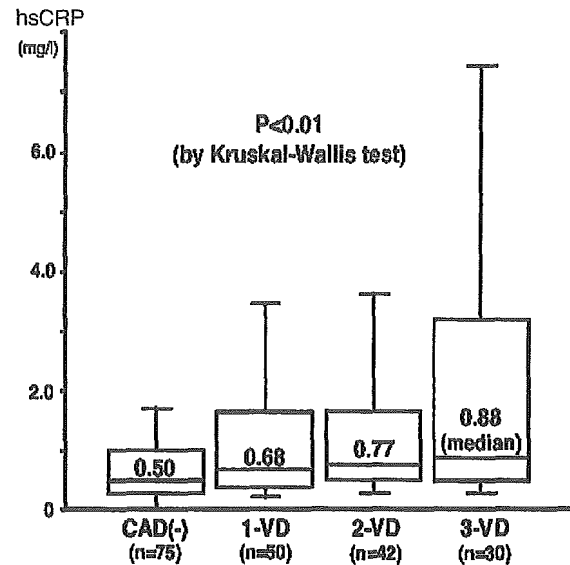


Fig. 1. The plasma hsCRP levels in patients with and without CAD. After the exclusion of patients with statins, a step-wise increase in the hsCRP levels was found depending on the number of >50% stenotic vessels. The central line represents the median, the boxes span from the 25th to 75th percentiles, and the error bars extend from the 10th to 90th percentiles. 1-VD, 1-vessel disease; 2-VD, 2-vessel disease; and 3-VD, 3-vessel disease.

presence of CAD was 4.4 (95% CI: 1.4–13.9) for the hsCRP level of >2.0 mg/l.

4. Discussion

We investigated the plasma hsCRP levels in 273 Japanese patients undergoing elective CAG: 175 with CAD and 98 without it. The hsCRP levels were higher in patients with CAD than in those without CAD. However, after the

Table 3

Associations of the presence of CAD with risk factors and plasma hsCRP levels (multiple logistic regression analysis in the 273 study patients and in the 197 patients without statins)

	Odds ratio	95% CI	<i>P</i> value
All study patients (<i>n</i> = 273)			
Age (per 10 years increase)	1.5	1.1–2.1	<0.02
Hypertension	1.9	1.1–3.3	<0.025
Diabetes	2.6	1.3–5.0	<0.01
HDL-cholesterol (per 10 mg/dl increase)	0.7	0.6–0.8	<0.001
Patients without statins (<i>n</i> = 197)			
Gender (male)	3.4	1.5–7.4	<0.005
Hypertension	2.8	1.4–5.4	<0.005
HDL-cholesterol (per 10 mg/dl increase)	0.8	0.6–0.9	<0.01
hsCRP >2.0 (mg/l)	4.4	1.4–13.9	<0.02

The dependent variable was the presence of CAD. The analysis included age (per 10 years increase), gender, hypertension, hyperlipidemia, diabetes, smoking, and HDL-cholesterol (per 10 mg/dl increase), and hsCRP (>2.0 mg/l) levels.

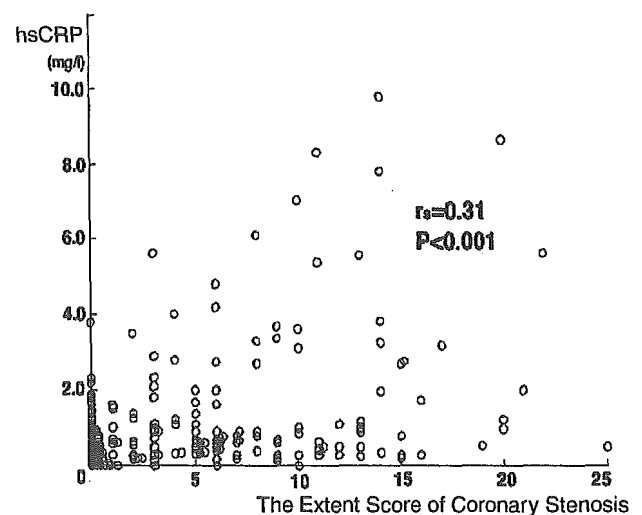


Fig. 2. The correlation between the plasma hsCRP levels and the extent score of coronary stenosis in 197 patients without statins. After the exclusion of patients with statins, the hsCRP levels correlated better with the extent score of coronary stenosis ($r = 0.31$).

Table 4
Reported hsCRP levels of patients with CAD

Study	Reference no.	Country	hsCRP (mg/l)	Method	Age (years)	BMI (kg/m ²)
Haverkate et al.	[8]	UK	1.7*	Abbott	56	N/A
Veselka et al.	[12]	Czech	2.8*	BNII	61	N/A
Rifai et al.	[11]	Syria	3.4	BNII	51	N/A
Erren et al.	[10]	Germany	4.0	BNII	61	26
Erbagci et al.	[13]	Turkey	11.3*	BNII	60	27
Zebrack et al.	[9]	USA	12.3	Abbott	N/A	N/A
Taniguchi et al.	Present	Japan	0.7	BNII	65	25

The hsCRP levels are presented as the median value (*geometric mean). Age and BMI are presented as the mean value. BMI, body mass index; N/A, not available.

exclusion of patients with statins, the hsCRP levels were found to be associated with the presence of CAD and the extent of coronary stenosis.

The association between the plasma hsCRP levels and the extent of coronary stenosis in patients with CAD remains controversial. Three studies reported no association between the hsCRP levels and the number of >50% stenotic vessels in 100–200 patients undergoing CAG [11–13]. However, these studies did not evaluate the numbers of stenotic segments or the extent score. Azar et al. [14] reported no correlations of the hsCRP levels with the extent score and the number of stenotic vessels in 98 patients. However, the correlations were assessed by simple linear correlations but not by Spearman's rank correlations. Moreover, 20% of patients had MI >2 weeks ago, and some had PCI >2 weeks ago. Hoffmeister et al. [15] also reported no correlation with the extent score. However, some patients were taking statins, and 62% of patients had MI within 2 years.

Haverkate et al. [8] showed that the hsCRP levels weakly correlated with the number of stenotic vessels in 2121 patients undergoing CAG, although 1030 patients were those with unstable angina. Zebrack et al. [9] also reported the correlations with the numbers of stenotic vessels and segments and the extent score in 2554 patients, but the correlation coefficients were very low (0.02–0.08). However, the correlations were evaluated by simple linear correlations, and 35% of their patients consisted of those with unstable angina. Erren et al. [10] reported the hsCRP levels to correlate with the extent score using Spearman's rank correlation test. The correlation coefficient was 0.29. Even in their study, 32% of patients had statins, and 5% were those with unstable angina. The hsCRP levels are affected by statins [19,20] and are elevated in unstable angina and acute MI [6]. After MI, CRP levels dramatically increase, returning to baseline levels in 3–4 weeks [23]. In the present study, we excluded any patients with MI within 6 months or those with unstable angina within 1 month. However, the hsCRP levels did not correlate with the number of stenotic vessels. After the exclusion of patients with statins, the hsCRP levels were found to correlate with the number of stenotic vessels and better with the numbers of stenotic segments and the extent score ($r = 0.30$ – 0.32). The hsCRP levels were an independent factor for CAD in patients without statins. Our results suggest that the inclusions of patients with statins as well as those with MI

or unstable angina mask the associations between the hsCRP levels and CAD. In patients with stable CAD who are not taking statins, the hsCRP levels would reflect the extent of coronary atherosclerosis.

Although some ethnic differences in the hsCRP levels have been reported between Indo-Asians and Caucasians [24], we recently reported the median value of the hsCRP levels in Japanese healthy people to be 0.2 mg/l [16], which seems to be much lower than those reported in other ethnic groups: 1.6 mg/l in Americans [17] and 1.9 mg/l in Turks [18]. In the present study, we showed the median value of the hsCRP levels in Japanese patients with CAD to be 0.70 mg/l, which was also much lower than those reported in other ethnic groups [8–13] (Table 4). Since obesity is known to increase the hsCRP levels [25], the lower hsCRP levels in Japanese patients with CAD may be due to smaller body mass index. A twin study showed the hsCRP levels to have a moderate degree of heritability [26], and some CRP gene polymorphisms were reported to influence the hsCRP levels [27,28]. Some genetic factors may also contribute to the low hsCRP levels in Japanese. However, further study is needed to elucidate the ethnic differences in the hsCRP levels between Japanese and other ethnic groups.

In conclusion, after the exclusion of patients who were taking statins, the plasma hsCRP levels were found to be associated with the presence and extent of coronary artery stenosis in patients with stable CAD. In such patients, the hsCRP levels would reflect the extent of coronary atherosclerosis. However, Japanese patients with CAD appear to have lower hsCRP levels than those of other ethnic groups, thus suggesting some ethnic differences in the hsCRP levels between Japanese and other ethnic groups.

Acknowledgment

Our study was supported by the Research Grant for Cardiovascular Disease (14-6) from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

References

- [1] Alexander RW. Inflammation and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1994;331:468–9.

- [2] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
- [3] Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Eng J Med* 1997;336:973–9.
- [4] Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998;98:731–3.
- [5] Koenig W, Sund M, Frohlich M, et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) Augsburg Cohort Study 1984 to 1992. *Circulation* 1999;99:237–42.
- [6] Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Eng J Med* 1994;331:417–24.
- [7] Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999;99:855–60.
- [8] Haverkate F, Thompson SG, Pyke SDM, Gallimore JR, Pepys MB, for the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet* 1997;349:462–6.
- [9] Zebrack JS, Muhlestein JB, Home BD, Anderson JL, for the Intermountain Heart Collaboration Study Group. C-reactive protein and angiographic coronary artery disease: independent and additive predictors of risk in subjects with angina. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:632–7.
- [10] Erren M, Reinecke H, Junker R, et al. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2355–63.
- [11] Rifai N, Joubran R, Yu H, Asmi M, Jouma M. Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease. *Clin Chem* 1999;45:1967–73.
- [12] Veselka J, Prochazkova S, Duchonova R, et al. Relationship of C-reactive protein to presence and severity of coronary atherosclerosis in patients with stable angina pectoris or a pathological exercise test. *Coronary Artery Disease* 2002;13:151–4.
- [13] Erbagci AB, Tarakcioglu M, Aksoy M, et al. Diagnostic value of CRP and Lp(a) in coronary heart disease. *Acta Cardiol* 2002;57:197–204.
- [14] Azar RR, Aoun G, Fram DB, Waters DD, Wu AHB, Kiernan FJ. Relation of C-reactive protein to extent and severity of coronary narrowing in patients with stable angina pectoris or abnormal exercise tests. *Am J Cardiol* 2000;86:205–8.
- [15] Hoffmeister A, Rothenbacher D, Bazner U, et al. Role of novel markers of inflammation in patients with stable coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2001;87:262–6.
- [16] Nakamura H, Yamashita T, Honma M. Predictive value of cardiovascular events by high-sensitivity CRP. *Nippon Rinsho* 2002;60:916–21 (in Japanese).
- [17] Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2001;103:1813–8.
- [18] Onat A, Sansoy V, Yildirim B, Keles I, Uysal O, Hergenc G. C-reactive protein and coronary heart disease in Western Turkey. *Am J Cardiol* 2001;88:601–7.
- [19] Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E, for the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999;100:230–5.
- [20] Plenge JK, Hernandez TL, Weil KM, et al. Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days: an effect independent of low-density lipoprotein cholesterol reduction. *Circulation* 2002;106:1447–52.
- [21] MAAS investigators. Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti-Atheroma Study (MAAS). *Lancet* 1994;344:633–8.
- [22] Corti R, Fuster V, Fayed ZA, et al. Lipid lowering by simvastatin induces regression of human atherosclerotic lesions: two years' follow-up by high-resolution noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation* 2002;106:2884–7.
- [23] Kushner I, Broder ML, Karp D. Serum C-reactive protein kinetics after acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 1978;61:235–42.
- [24] Chambers JC, Eda S, Bassett P, et al. C-reactive protein, insulin resistance, central obesity, and coronary heart disease risk in Indian Asians from the United Kingdom compared with European whites. *Circulation* 2001;104:145–50.
- [25] Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *J Am Med Assoc* 1999;282:2131–5.
- [26] Retterstol L, Eikvar L, Berg K. A twin study of C-reactive protein compared to other risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003;169:279–82.
- [27] Zee RYL, Ridker PM. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis* 2002;162:217–9.
- [28] Brull DJ, Serrano N, Zito F, et al. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2063–9.

読賣新聞

2004年(平成16年)1月25日 日曜日

発行所
読売新聞東京本社
第45919号

〒100-8055
東京都千代田区大手町1-7-1
電話 (03)3242-1111(代)
<http://www.yomiuri.co.jp/>

感染不安ない人工血液

早・慶大など開発 2年後実用化目指す

血液中に含まれるたんぱく質の一つ、アルブミンに酸素を運ぶ能力を持たせた「人工血液」を早稲田大、慶応大、熊本大などのグル

ープが開発した。大量生産と長期保存が可能で、ウイルス感染や血液型不適合の心配のない安全な輸血に道を開くと期待されている。グループは動物実験で効果を確認しており、二年後の実用化を目指す。

酸素は、赤血球に含まれるヘモグロビンというたんぱく質に結合し体内組織へ運ばれる。米国ではヘモグロビンを加工した人工血液が作られたが、血圧上昇などの副作用があり、人への使用は認可されていない。土田英俊・早大名誉教授らのグループは、血圧を維持し、様々な物質を体内に運ぶ役割を持つアルブミンに着目。ヘモグロビンと同様に、鉄を中心を持つヘムという分子を組み入れたア

ルブミンヘムを作り、肺で酸素を吸収し、体内の組織で放出する機能を持たせることに成功した。

赤血球より小さいので、血栓のできた部分にも酸素を供給でき、脳こうそくなどの治療に使える可能性もある。アルブミンを遺伝子組み換えで作る手法を日本の医薬品会社が開発して臨床試験を終えており、アルブミンヘムの量産にもめどが立っているという。

研究グループの小林紘一・慶応大教授は「室温で長く保存でき、いつでも使える。献血不足を解消できるだろう」と話している。

感染血液「すり抜け」なぜ?

速さ・安全 どう両立

日赤の高感度検査施設に見る

献血された血液はまず各地の血液センターでウイルス感染の証拠を示す抗原・抗体の有無が調べられる。しかし、これだけでは抗体がでないごく直近の感染を見逃すため、NAT施設でウイルスそのものが血液中に含まれていないかどうかを確認する。対象はB型肝炎(C型肝炎、エイズ(HIV)の各ウイルスで、NATも「合格」した血液だけが、輸血などに使

まとめて50人分⇒20人分に

1人当たりの検体量増やす

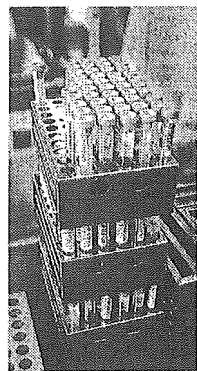
●「限界」の中、対策●



NATに使用される核酸抽出装置―東京都大田区の日赤中央血液センターの核酸増幅検査部で、いずれも山下浩一写真

ウイルス感染した献血者の血液が、日本赤十字社が安全性確保の「切り札」としている高感度の核酸増幅検査(NAT)をすり抜けてしまふ事例があることが問題となっている。昨年末には、検査をすり抜けた血液を輸血された患者がエイズウイルス(HIV)に2次感染したことも明らかになった。日赤のNAT施設を訪れ、検査の実際と「限界」がなぜあるのかを探った。

【江口一】



献血された血液の一部をNATに送るため、キャップをした検体―東京都大田区の都赤十字血液センターで

用できる仕組みだ。

全国3カ所のNAT施設のうち、全体の約60%に当たる1日約1万人の血液を調べる日赤中央血液センターの核酸増幅検査部を訪れた。白衣に着替へ、靴の裏の付着物を粘着質のマットで取り除き、施設内に入った。

プール検体を核酸抽出装置に入れ、ウイルスの核酸(DNAまたはRNA)を取り出し、試薬でその一部を2時間半かけて約1億倍に増幅する。その結果、わずかもウイルスの抗体検査をパスし

たかうかをコンピュータで確認した後、一人一人検体から0.1mlずつ抽出し、50人分まとめて一つの「プール検体」とする。

これは機械4台による作業だ。「血液が飛び散ったらずと、ウイルス汚染が施設全体が使用不能になる恐れがある(同センター)ため、むやみに機械の速度をあげることとはできない。1時間間で1700人分の処理が限界だ」という。

血小板の保存期限は72時間

「まず赤血球 実用化の期待」●研究進む人工血液

まず赤血球 実用化の期待

■「型」を選ばない

■感染症心配なし

■長く保存できる

3週間と短く、感染リスクもゼロではない。

早稲田大の土田英俊名誉教授は80年代、慶応大の小林純一教授と共同で、酸素を結合するヘモグロビンを脂質の膜で二重に包んだ「ヘモグロビン小胞体」を考案した。

血液の半分を抜いたら

ウイルスがあると核酸が検

出され、感染と分かる。

日間、C型肝炎で同23日間、HIVで同11日間の検出は難しいとされる。

検体にウイルスが含まれないほど、感染者のウイルスが微量だと、見つかるのは不可能だ。柚木部長も「全力を尽くしては限界があるのも事実」と認める。日赤によると、NATで99年から今年2月までにウイルス感染を見つけたのは、検査した24355万6314人のうち541人分だった。

日赤は「すり抜け」問題を重視し、今後はプール検体の人数を50人から20人に減らし、1人当たりの検体の血液量を増やすことで、より微量のウイルスでも検出できるようになる方針だ。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

99年で、「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

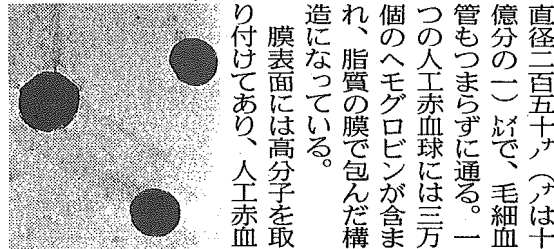
「世界最高水準の安全を確保した」という。だが、感染直後はウイルスが微量で、検査をすり抜けてしまう期間(ウィンドーピリオド)があり、完ぺきではない。

人工赤血球を量産

ニプロなど、安定供給に道

医療品メーカーのニプロとベンチャー企業のオキシジェニクス(東京・港)、早稲田大学、慶応義塾大学の研究グループは、長期保存できる人工赤血球Ⅱ写真Ⅱの量産技術を開発することに成功した。人工赤血球は血液型によらず輸血できるとされ、災害対策用医療品として備蓄することに道を開く一歩。専門学会の評価を踏まえた上で臨床試験を目指す。

開発したのは二社のほか、早大の土田英俊名誉教授、武岡真司・助教授、慶大医学部の小林紘一教授と末松誠教授の研究グループ。厚生労働省の支援を受けて取り組んだ。人工赤血球の大きさは



直径二百五十ナノ(ナ)は十億分の一)で、毛細血管もつまらずに通る。一つの人工赤血球には三万個のヘモグロビンが含まれ、脂質の膜で包んだ構造になっている。膜表面には高分子を取り付けてあり、人工赤血

球同士がくっつき凝固するのを防いだ。ヘモグロビンは廃棄処分となるヒトの赤血球から抽出したものを有効利用する。研究グループはヘモグロビンの量や、脂質を混ぜ合わせる際の温度などを調整して、膜中のヘモグロビン濃度が九九・九%以上の人工赤血球を量産する技術を確認。形状も一様で、安定供給できるといふ。サルを使った実験段階

では安全性に問題は認められなかった。今後、日本血液代替物学会に評価を依頼、結果を踏まえた上で二〇〇六年にも臨床

試験を始める。人工赤血球は厚生労働省や経済産業省が後押しして長年研究が続けられてきた。だが、ヘモグロビン

の濃度が高く品質の安定した人工赤血球を量産するのが難しかった。赤血球が凝固する課題もあり、欧米でも実用化され

ていない。研究チームは二〇一〇年まで臨床試験を続け、二〇一二年の販売を目指す。

21世紀の 先駆技術

赤血球に代わり体内で
だ人工赤血球の開発に取
酸素を運ぶ人工赤血球の
り組んだ。

研究がいよいよ臨床試験
へ進もうとしている。「よ
うやくこまできた」。

約二十年間、研究を続け
てきた早稲田大学助教授
の武岡真司(41)は感慨
深く振り返る。

人工赤血球研究臨床へ

研究に携わったのは学
部生時代から。それまで
は十億分の二のサイズの
の講義や実験に満足でき
なかった武岡は指導が厳
しいと評判だった早大教
授、土田英俊の研究室に
進んだ。

実験好き。少年時代は
押し入れの実験室で好奇
心を満たしていた自他共
に認める「変な子だっ
た」。土田研究室でヘモ
グロビンを脂質でくるん
か理由が分からない。

「一から調べるしかな
い」。意を決して温度や
分子の重合度など二十
三十ある生成条件を一つ
ずつ調節し始めた。

二年ほどかかったが、
修士課程一年の終わりに
は自在に分子や穴の大き
さを変えて生成するノウ
ハウを蓄えた。「この経
験が大きな自信になっ
た」。

企業との共同研究が頓
挫するなど、研究が進ま
ず研究チームの雰囲気か
暗い。実験がうまくいっ
た。偶然の一言で片づ
く。自信を持って開発した

一つ一つ積み上げ成果

早稲田大学助教授

武岡 真司氏

(たけおか・しんじ) 一九六三年生ま
れ、東京都出身。九一年早稲田大学理工学
研究科修士、同学部助手。九三年専任講師、
九六年より現職。九八・九九年ベンシルベ
ニア大学の客員研究員を務め、

酸素を運搬する機能のある血
液の代替物で、血液型によらず
輸血できる。多数のヘモグロビ
ンを脂質の膜で覆った構造。直
径約二百五十ナノは十億分の
一ほど小さいため、毛細血管
でも詰まらずに通る。一つの人
工赤血球には三万個のヘモグロ
ビンが含まれる。膜表面には高
分子が取り付けられており、人工赤
血球同士がくっつき凝固するの

人工赤血球

血液型によらず輸血可能

を防いでいる。
厚生労働省などの支援を受け
て長年にわたり研究されてきた
が、異物の混入やヘモグロビン
の濃度などに問題があり、安定
した品質で量産するのが難しか
った。南アフリカやロシアでは
牛のヘモグロビンなどを使った
製品の実用化も始まっており、
米国でも臨床試験の最終段階に
入っている。

人工赤血球だが簡単に
は約一カ月も異物が混じら
生物に使えなかった。初
めての動物実験では注射
した途端には酷だった。論文にもな
死んでしまらない量産作業に「これ
った。衝撃は研究じゃない」と学生
のあまり体がストライキを起こし
た。感えが止まらず、喪失
感を味わった。

丹念に調べると、人工
赤血球の膜となる脂質の
純度が低いことが原因が
あった。そこでクリーン
ルームでの生成を始め
た。ただし、学生たちには
企業が見つかった。ここ
にこう言わせる。
押し入れの実験室で好
奇心を満たしていた研究
の虫は、人工赤血球を実
用化する夢をかなえらる
ために、毎日何か新しい発
見がないかと実験室に通
る。敬称略
(松田省吾)

医療

外科手術などで輸血を受ける患者は、全国で年間百万人を超える。献血血液への高精度検査の導入で、ウイルス感染の恐れは極めて小さくなったが、人為的なミスや副作用などが各地で起きている。しかも、そうした危険を排除すべき医療現場の対策にはかなりの濃淡がある。安全をめぐる輸血医療の現状をレポートする。

■各地で起る事故 千葉 県茂原市の公立長生病院。昨年、手術中のO型の女性患者にA型を輸血し、女性は何時間後に死亡した。手術前の検査で誤って同姓の男性患者から採血、その血液型で取り寄せた血液を輸血していた。

宮崎大病院でも今年三月、吐血したO型の男性患者がA型を輸血された後に死亡した事故が起きている。極めて初歩的なミスの「A B O型不適合」輸血。だが、実は珍しいことではない。全国の三百床以上の病院を対象にした日本輸血学会の調査では、一九九九年までの五年間に二〇〇の病院で発生。死亡率は一〇%前後とされる。

免疫反応などによる副作用も患者にとって脅威だ。血液型はA B OやRhだけでなく、細かく見ると四百種類以上あるとされる。A B Oが同じでも、それ以外の血液型に対する抗体(不規則抗体)があると発熱やじんましん、呼吸困難などが起きることがある。

慶応大病院が三年分の輸血患者を調べたところ、急性の副作用だけで患者の六%前後に発生。大半が軽症だったが、重症例もあった。全国の医療機関から日本赤十字社への報告でも、死に至ることもある。

血液型不適合で副作用



副作用を防ぐため輸血前に念入りに検査 (東京都文京区の都立駒込病院)

輸血の安全道半ば

「輸血関連急性肺障害(T R A L I)」が過去六年間に疑い例も含め百件に上った。細菌感染の危険もある。二〇〇〇年春、慈恵医大付属相模原病院で血小板の輸血を受けた男性がショック状態に陥り死亡。病院側は「血小板に混入していた肺炎球菌が原因」と結論付けた。皮膚の表面などにいる細菌が採血時に混入、増殖して輸血患者に敗血症などを引き起こす。欧米では多くの死亡例が報告されて

いるが、日本の実態はよく分かっていない。■防止は努力次第 こうした危険は「輸血用血液の正しい保管や輸血前検査の徹底など、医療機関側の努力で防げるものも多い」と都立駒込病院(東京都文京区)輸血・細胞治療科の比留間潔部長は指摘する。約八百床の同病院は輸血専任の常勤医師二人、検査などを担う専任技師七人の

輸血による急性副作用発生状況 (慶応大病院の院内調査) (患者ベースの発生率)

	2000年	01年	02年
輸血患者数	1,884人	1,903人	1,978人
副作用発生数	106人	127人	130人
発生頻度	5.6%	6.7%	6.6%

(血液製剤別の発生率)

	血小板	新鮮凍結血しょう	赤血球	自己血
じんましんなど	5.9%	2.0%	0.6%	0.3%
発熱反応	0.8%	0.2%	0.5%	0.4%
呼吸困難 (T R A L I)	0.02%	—	—	—
アナフィラキシー様反応	0.2%	0.2%	—	—
合計	7.0%	2.3%	1.0%	0.7%

手厚い体制を敷く。患者の血液は数十種類の不規則抗体を調べ、適合する血液を選択。実際に輸血と患者の血液を少量混ぜてみる「交差適合試験」も一回ごとに行う。検査や報告書の作成は複数のスタッフで。輸血後は急性副作用の有無を必ず各診療科から報告させる。

減らぬ人為ミス 現場の対策に差

大阪府岸和田市の市立岸和田市民病院(三百五十床)はこの規模の病院には珍しく輸血用血液の管理を薬剤部から検査部に移し、発注から保管、検査、手術室などへの出庫までを一元化。携わる人員を少なくしてミスの発生危険を減らす狙いだ。詳細な輸血療法マニュアルも作成し、責任医師と院内の「輸血療法委員会」がにらみを利かせる。

■さまざまな実態 輸血療法委員会の設置はすでに一九九九年、厚生省(当時)が輸血業務の責任医師、担当技師の配置とともに指針で打ち出している。ところが、今年の調査では委員会を置いていたのは五六%、責任医師は四四%にとどまる。多くの病院が「院内の輸血副作用を把握できない状況」(都立駒込病院の比留間部長)にある。

「厳密に温度管理すべき」赤血球を食品と同じ冷蔵庫で保管していた「新鮮凍結血しょうを電子レンジで解凍した」——昨年度、東京都が初めて調査した輸血用血液の取扱状況からは、一部医療機関のさまざまな実態が浮かぶ。関係者は「Rhプラスとマイナスさえ知らずに輸血した産婦人科医もいる」と明かす。杏林大医学部の清水勝客員教授は、輸血医療を手がける医療機関の絞り込みと安全対策の徹底を提言する。日赤の輸血用血液の供給先は昨年度で約二万二千に上るが、年に数回程度しか輸血しない病院も多いとされる。清水教授は「輸血医療を行う病院は数分の一に減らし、それ以外の医療機関から患者を搬送する原則にしたい。英国でも輸血できる病院は三百前後だ」と話している。

普及する「自己血」 人工血液の開発も

副作用などのリスクを極限まで小さくしようと、新たな輸血医療も登場している。普及しつつあるのが、手術前に患者本人から採取した血液を使う「自己血輸血」。天皇陛下の前立腺がんの手術でも使われ、日本輸血学会の認定施設では昨年、手術の三五%が自己血輸血だけで行われた。ただ、「きちんとした管理のもとに行わないと大変危険」(都立駒込病院の比留間部長)。採血時の消毒や保管がずさんだと、細菌汚染や、他人の血液と取り違える恐れがあるからだ。人工血液の開発も進む。感染症の恐れがなく血液型を問わない。長期

保存も可能だ。慶応大と早稲田大の研究グループは人工赤血球を開発中。ヒトの赤血球の中に詰まっているたんぱく質「ヘモグロビン」を人工の脂質膜で包んだ構造で、この膜を通して酸素をやりとりする。大の実験では、四割を人工赤血球に置き換えても異常なかった。もっとも、これも直ちに決定打になるわけではない。海外企業が別の手法でつくった人工赤血球は、血管収縮の副作用を起こすことが臨床試験で判明。両大学は慎重に研究を進め、三年以内に臨床試験を始めたいとしている。

▼輸血副作用 輸血による副作用が疑われ、医療機関が日赤に報告する症例は毎年増え続けており、2003年は感染症も含め1606件に上った。最も多いのは「じんましんなど」の554件。呼吸困難など重い全身症状が出る「アナフィラキシー(様)反応」と、

ことば

それに血圧低下を伴う症例も計336件あった。ただ、医療現場では副作用が疑われても「主治医が処置するだけのケースが多い」(関係者)という。日赤への報告は多くても実数の6分の1程度との推計もあり、全国の実態ははっきりしない。

◎意見 情報セキュリティ(CO-52555-24) か電子メール (ryou@tokyo-nikkei.co.jp) でお寄せください。お住まいの都道府県名、年齢、職業、性別もお書き添えてください。

人工血液がもたらす未来の救急医療像を模索

血液に代わる機能を持つ血液代替物(人工血液)の開発が1980年以降活発に行われている。酸素運搬体である人工赤血球については海外で既に臨床使用されている製剤もあり、わが国でも研究が積極的に進められているが、いまだ臨床応用には至っていない。札幌市で開かれた第11回日本血液代替物学会(会長＝札幌北橋病院・川村明夫理事長)のシンポジウム「血液代替物の臨床応用」(司会＝千葉大学大学院救急集中治療医学・平澤博之教授、慶應義塾大学内科学・村田満講師)では、臨床使用の可能性を期待させる動物実験の成果が報告された。

～パーフルオロカーボンによる液体換気療法～ 通常の人工呼吸で対応できない重症呼吸不全に光明

酸素および二酸化炭素を多く溶解できるフッ素化合物の液体であるパーフルオロカーボン(PFC)は血液代替物として研究されながらもいまだ臨床使用されていないが、近年では新しい利用法として液体換気療法への応用が目ざされている。千葉大学大学院救急集中治療医学の松田兼一講師は、液体換気療法の現状と可能性について報告。「臨床応用には課題が多いものの、近い将来には救急医療において必要不可欠な治療法になるだろう」と述べた。

肺洗浄、肺拡張効果で 肺酸化能を促す

液体換気療法の試みは古く、第一次世界大戦で毒ガスに曝露した兵士の肺洗浄の研究から始まり、1962年の高圧下でのマウスの沈溺実験で本格化。現在は水よりもはるかに高い酸素・二酸化炭素溶解度を有するPFCで肺を満たす、全く新しい人工呼吸法が検討されている。PFCによる肺洗浄と、虚脱に陥った肺にPFCが容易に浸入することで肺の拡張とそれによる肺コンプライアンスおよび肺シャントの改善、肺胞内での好中球集積抑制で炎症性サイトカインによる情報伝達の遮断が期待でき、通常の人工呼吸では対応できない重症呼吸不全に対しても肺酸化能が向上すると考えられている。

1989年には乳幼児の呼吸不全に対する臨床試験が初めて実施され、専用呼吸器を用いるtotal liquid ventilation(TLV)に代わり、肺内にPFCを充填したうえで従来の酸素ガスを用いた人工呼吸を行う、専用機を必要としないpartial liquid ventilation(PLV)が臨床試験の本流となり、95年から欧州で複数行われた多施設臨床試験で急性呼吸促進症候群に対する有効性が実証された。

一方、2000年に北米と欧州の36施設

～人工赤血球を用いた人工心肺充填液～ 新生児の心臓手術への応用目指し検討中

人工赤血球は血液型の不適合による免疫性の副作用、血液中に潜在する肝炎ウイルスやHIVによる感染の問題を回避できる利点がある。慶應義塾大学心臓血管外科の山崎真敬氏は「輸血に頼らざるをえない新生児への開胸手術での人工心肺装置に人工赤血球を使うことで、臓器への酸素供給が十分に行われるとともに、感染の危険を防ぐことができる」と述べた。

311例を対象に検討した結果、PLV群と対照群で生存率に差はなかったが、松田講師は「同試験の対象症例は動物実験で有効性が示された急性呼吸促進症候群だけではなかった。また、施行中はPFCを補充するのみで肺内PFCの全交換が行われなかったなど、方法も適切ではない」として、「同試験ではPLVの有効性を最大限に発揮できなかった。至適条件を確立したうえで再び実施されるべき」との見方を示した。

従来型人工呼吸ではないどの 認識を

松田講師と研究グループの平山陽氏らは、これまでも肺障害モデルラットでのPLVの肺内滲出液洗浄除去効果、肺酸化能の改善、メデイエータ産生抑制効果などを確認している。また、TLVについても重力を利用したラット専用呼吸器を開発しており、本格的な動物実験を可能にした。

ラットに肺障害を起こさせ、48時間後にこの機器を用いて2時間のTLV治療を行った後、7日目に肺線維化の過程で産生される α -SMAのmRNA発現量を調べた検討では、TLV治療群は対照群に比べて α -SMAのmRNA発現量が抑えられた。松田講師は「TLVは肺線維化予防に有効であり、これは肺線維化の過程で産生される種々のメデイエータを抑制したPFCの炎症反応抑制効果」と推測している。

液体換気療法の課題は、高比重の液体で肺を満たすために肺損傷を起こしやすいこと、心臓にも圧がかかるために血行動態に影響がでることだ。同講師は「臨床応用では従来の人工呼吸とは全く違うことを認識した長期的な検討が行われなければならない」と締めくくった。

欠点である半減期の短さを 逆利用

新生児への心臓手術の成績は大きく向上しているが、体重3kgの新生児の循環血液量は200mL程度であり、このような低体重の患者に対して近年の人工心肺装置を使用した場合、無輸血充填では充填量が限界まで少なくなつたとしても運転中に血液が希釈されるため、臓器への適正

な酸素供給が保証されなくなるとの問題が残っている。このため、新生児に対しては輸血血液を充填せざるをえないが、これには感染のリスクがある。山崎氏はこのジレンマを解決する手段として、ナノテクノロジーの産物であるヘモグロビン(Hb)小胞体(Hbを小胞に封入した人工赤血球)に注目。「短時間の血液希釈なら輸血に代わってHb小胞体で補えるのではないか」との仮説を立て、人工心肺充填液の研究を重ねている。

現段階の人工赤血球は半減期が30時間程度と短いのが欠点だが、人工心臓稼働中に生ずる血液希釈状態は数時間程度であり、同氏は「その数時間だけ血液として酸素を運搬する役割を果たし、その後、速やかに代謝されるのなら、Hb小胞体は小児の開心術が抱える問題を解決に導く」と説明。同氏はラットを用いて慢性人工心臓モデルを作製。体重400gのラットの循環血液量は22mLであり、人工心臓にはHb小胞体を用いた充填液を30mL充填し、新生児への人工心臓使用に近い状況で検討を開始した。

その結果、術前の人工心臓中のヘマトクリット値(血液に対して血球成分が占める割合)は43%だが、運転中は希釈されて12%にまで減少した。しかし、Hb小胞体がラットの各臓器への酸素供給を補っていることが確認されており、術後のラットの行動に術前との差異は認められな

～人工赤血球による40%血液交換～ ラットは犠牲死させるまで生存

早稲田大学理工学総合研究センターは慶應義塾大学呼吸器外科と共同で、輸血システムを補完する人工赤血球の実現を目指しており、「ヘモグロビン(Hb)小胞体分散液が赤血球と同等の酸素運搬機能を有する最有力の物質系」と提案している。同センターの酒井宏水助教授は、Hb小胞体による血液交換の可能性を検討。ラットで循環血液の40%を交換して回復過程を見た実験では、全例とも犠牲死させるまで生存していたと報告した。

同助教授らはラット40匹について、Hb小胞体をアルブミンに分散させた溶液、またはアルブミン単独の溶液で脱血を繰り返し、臨床現場で想定される血液交換率40～50%を考慮して、ラット循環血液の40%を交換。14日後までの血液学的・血液生

次世代医療に不可欠な 人工血液開発

緊急医療に必要不可欠となる血液代替物としての酸素輸液(人工赤血球)は、次世代医療の重要な課題に位置付けられており、長期間備蓄できる安全で血液型不適合の心配のない人工赤血球がいつでも供給できるようになれば、災害医療対策が大きく進展する。また、人工赤血球は赤血球よりも小粒径で粘度も低いことから、体組織や臓器の酸素化に有効であり、術前血液希釈液、体外循環や移植を含めた臓器保存灌流液、梗塞部位への酸素供給液、組織再生のための人工臓器細胞培養液などに期待されている(図)。

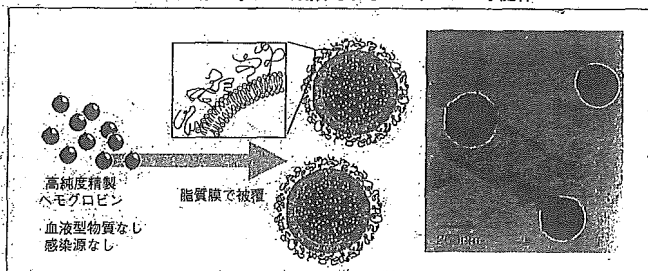
また、酸素供給が絶たれると最も早く障害を受ける海馬についても術前、術後7日目で神経細胞の脱落などの病理学的変化は認められず、肺、肝、腎などについても特に異常はなかった。

以上から、同氏は「ラット慢性人工心臓モデルでの人工赤血球使用は技術上の問題もなく、人工心臓装置で人工赤血球を安全に使える可能性が示唆された」と述べ、「今後は低酸素状態下の脳領域での検討を重ねることで効果を証明し、大動物、さらには臨床応用につなげていきたい」と展望した。

化学的検査と臓器の重量測定、組織病理学的検討を行った。

その結果、両群ともにヘマトクリット値は7日後に完全に回復し、1～3日後に脾臓肥大が見られた。特にHb小胞体投与群で顕著であったが、いずれも7日後には完全に正常値に復した。同助教授は「原因はHb小胞体の捕捉分解だけではなく、ラットに特有の脾内造血の亢進が考えられ、これがヘマトクリット値の急速な回復に貢献した」と推測している。Hb小胞体投与群では14日後に肝と脾にわずかにヘモデジン沈着が認められたが、血液生化学的検査では鉄/ビリルビン濃度や肝機能のマーカーに異常はなかった。同助教授は「Hb小胞体が老化赤血球と同様に速やかに分解され、排泄あるいは再利用されているようだ」と見ている。

〈図〉人工赤血球として期待されるヘモグロビン小胞体



(提供：酒井宏水助教授)

Fake blood may save thousands of lives

From Leo Lewis in Tokyo

AFTER 25 years of false dawns and setbacks, a Japanese professor claims to have cracked one of medical science's greatest challenges by producing entirely synthetic red blood cells.

The development takes Professor Eishun Tsuchida and his group of biochemists at Waseda University, Tokyo, to the very forefront of an intensely competitive global race. Researchers believe that one day it could remove the need for human blood donors.

Talking exclusively to *The Times*, Professor Tsuchida described the sight of the world's first litre bottle of synthetic blood as "beautiful" and something he is delighted to bring to humanity. He is working on a process that could mass produce the blood and, having proved its effectiveness and safety on monkeys and rats, will shortly begin testing it on human volunteers.

Mark Vickers, a consultant haematologist at the University of Aberdeen and member of the British Society of Haematology, advised caution. "Anything is possible, but people have been working at this for many, many years," he said. "Synthetic haemoglobins have turned out to have all sorts of

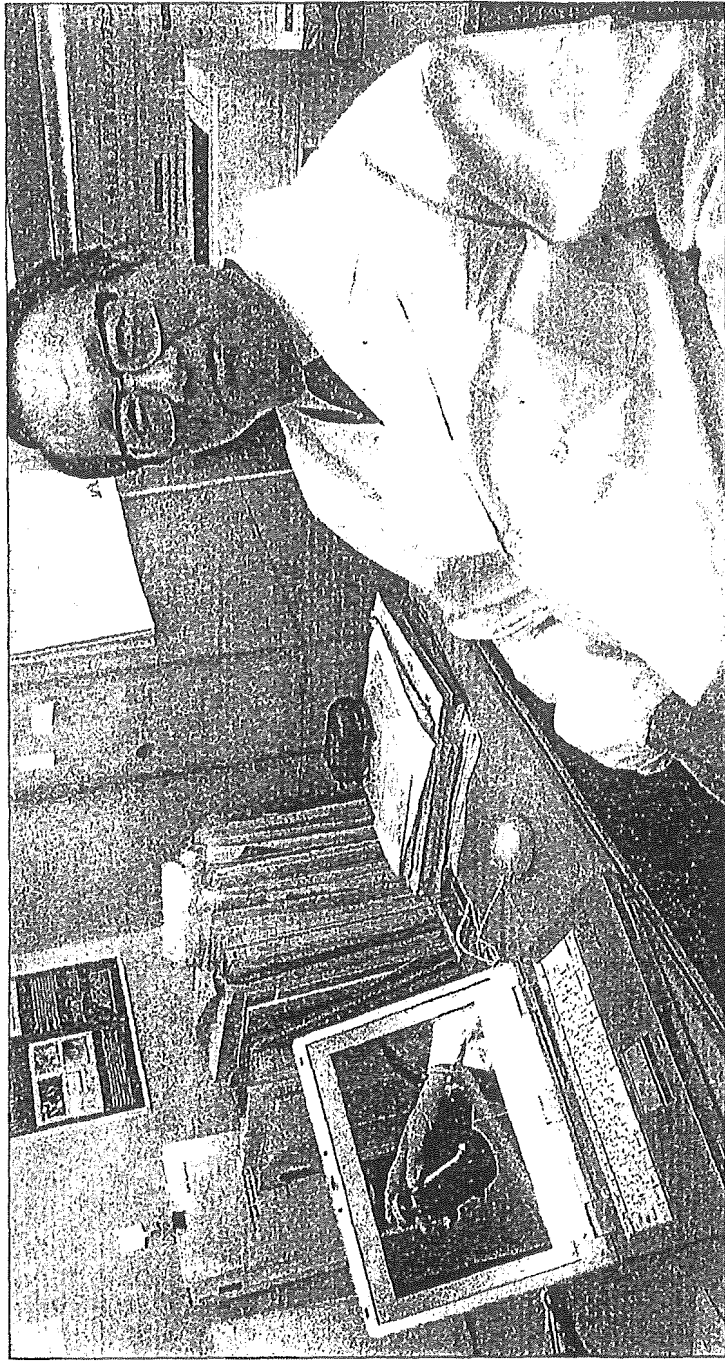
unpredictable side effects in clinical trials. If it's good, it's great, but there is a long way to go down the line yet."

The product, which remains the subject of round-the-clock laboratory trials, has several huge advantages over the real thing. It is not blood-type specific so can safely be given to any patient; it does not need screening for disease or contamination; and it can be stored at room temperature for up to two years. Normal blood, by contrast, must be refrigerated and destroyed after two to three weeks.

"Can you imagine its value in emergency situations?" Professor Tsuchida said. "Ambulances or any first aid vehicle could carry around the artificial blood without complicated storage mechanisms, knowing that they could instantly inject it into anyone who needed a transfusion."

Academic researchers and private companies across the world have been trying for decades to create a viable alternative to using human blood in transfusions and surgical operations. The standard blood donation process relies on the constant goodwill and generosity of the public and carries a variety of potential health hazards for the recipients.

The Waseda team is one of many research groups



Professor Tsuchida in his laboratory at Waseda University, and below with a bottle of synthetic blood. "Can you imagine its value in emergencies?" he said

worldwide devoted to artificial blood. British, Japanese and American researchers have already produced artificial cells using human hemoglobin, but the Waseda effort is so far the only one to use entirely synthetic materials.

Professor Tsuchida's secret is to synthesise the protein albumin using yeast as the basic material and as an alternative to hemoglobin — a breakthrough that solves the critical problem that hemoglobin molecules are simply too small to be injected directly.

British scientists acknowledged that while synthetic blood would be a major medical advance, success in human trials remained a distant prospect. Clinical trials in Japan are due to begin in 18 months. On the northern island of

ate a litre of artificial blood, and that it could take a long time before mass production methods bring that figure down to more manageable levels.

He also worries that as well as creating a demand for artificial blood, Japan's rapidly ageing population may present its own hurdles. The blood demand created by longer life-spans and a burgeoning number of over-50s is rising by nearly 10 per cent every year, while the number of donors falls. All this creates a desperate need for artificial blood.

While he is now fully confident that the science itself has been cracked, he stops short of saying that his dream of artificial blood for all transfusions will soon be reality.

He admits that it currently costs about £57,000 to gener-



based compound heme — also produced in a laboratory — is added, the finished product is capable of absorbing oxygen at precisely the same rate as real blood. To the joy of its creators, the artificial blood is a rich, dark red.

"There was a stage where it

NEWTON SPECIAL

SFではない!

驚異の近未来

マンモス復活/人工視覚/電子ペーパー/

網膜のそばに電極を埋めこんで失明患者に光を取りもどそうという、SFの世界のような研究が、その実現に向かって着実に歩を進めている。開発担当者によると、早ければ2010年ごろには「人工視覚システム」が製品化されるという。

近縁種のゾウの卵子を利用して、シベリアの永久凍土の下に眠るマンモスを復活させようとする研究者もいる。にわかには信じがたい話だが、近年のクローン技術の進展をみればあながち絵空事とはいえなくなってきた。

今月号のNEWTON SPECIALでは、近未来に実現しそうなテクノロジーのうち、革新的で思わずおどろかされる研究や、私たちの生活を大きくかえる可能性を秘めた研究の数々を紹介する。研究者たちが追い求める夢に耳を傾けながら、近未来の社会をのぞいてみよう。

協力

入谷 明

近畿大学生物理工学部教授

小澤素生

株式会社ニデック人工視覚研究所長

満洲邦彦

東京大学大学院情報理工学系研究科教授

鈴木隆文

東京大学大学院情報理工学系研究科特任准教授

太田健一郎

横浜国立大学教授・水素エネルギー協会会長

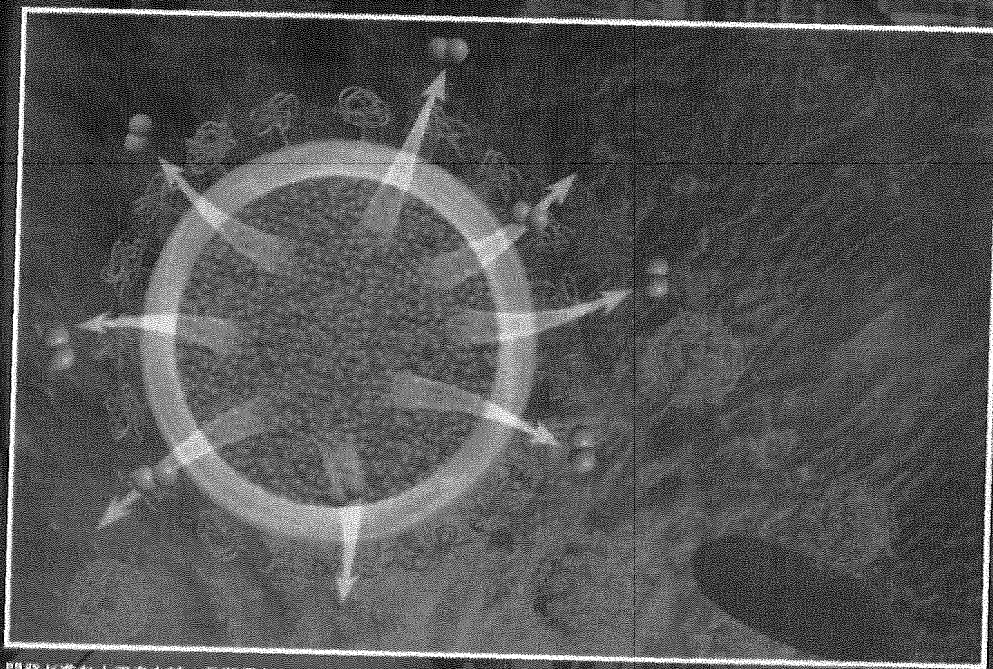
日本原子力研究所

箕浦秀樹

岐阜大学大学院工学研究科教授

テクノロジー

着るコンピューター／進まない光



開発が進む人工赤血球。長期保存が可能で感染の心配もなく、輸血用血液の不足を補う画期的なテクノロジーである。

土田英俊

早稲田大学名誉教授

酒井宏水

早稲田大学理工学総合研究センター助教授

小松晃之

早稲田大学理工学総合研究センター助教授

武田展雄

東京大学工学部航空宇宙工学科教授

吉田 司

岐阜大学大学院工学研究科助手

塚本昌彦

神戸大学工学部電気電子工学科教授

檀上英利

三菱電機株式会社電子デバイス事業推進部長

山本 学

東京理科大学理工学部電子応用工学科教授

長谷川洋作

財団法人 未来工学研究所長

「人工赤血球」で慢性的な輸血用血液の不足を補う

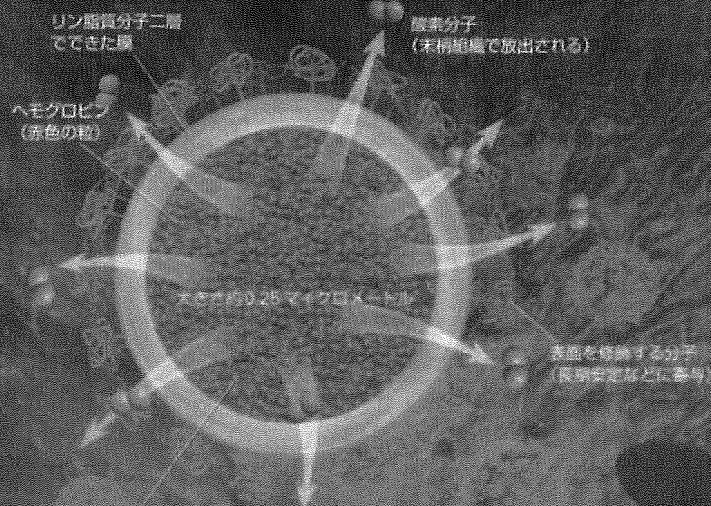
工場で大量合成できる輸血用の「人工赤血球」。そんなおどろくべき技術の実現が近づいてきた。

少子高齢化の進行とともに輸血用血液の不足が懸念されている。血液の保存は3週間までしかできない。そのため、つねに献血をつのらなくてはならないのが現状だ。しかし人工赤血球なら年単位の長期保存が可能で、感染の心配もなく、血液型を気にする必要もない。

では人工赤血球とはどのような物質なのだろうか？ 生体の赤血球の内部には、酸素を運ぶ「ヘモグロビン」が詰まっている。「しかしヘモグロビン単体を使うと副作用が出てしまいます」。そう語るのは、人工赤血球の開発を進める早稲田大学の土田英俊 名誉教授だ。アメリカでは、ヘモグロビンを重合させたり、別の高分子を結合させるな

どして血圧上昇などの副作用を克服する試みが行われたが、うまくいかなかった。そこで土田名誉教授らが開発したのが、3万個ほどのヘモグロビンを脂質膜におおった直径約250ナノメートルの「ヘモグロビン小胞体」である。ヘモグロビン小胞体はすでに霊長類で安全性が確認され、製造装置の基本設計も終わっている。ヘモグロビン小胞体は現在、期限切れの血液からヘモグロビンを高純度に単離して製造しているが、人工合成も可能だ。

土田名誉教授らは、ヘモグロビンを必要としない「アルブミンヘム」という大きさ約8ナノメートルの完全合成型人工赤血球の開発も進めており、こちらも副作用の問題をクリアしているという。数年後にはこれらの人工赤血球が医療の現場に大きな恩恵をもたらすことが期待される。



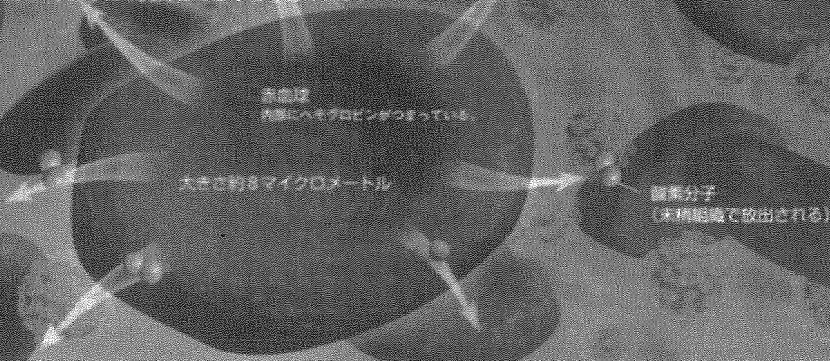
脂質の膜で覆われたヘモグロビン小胞体

土田名誉教授らが開発を進めるヘモグロビン小胞体の断面図。多数のヘモグロビンを脂質の膜がおおっている。分子の自己組織化（自発的に秩序ある構造が生まれること）を利用して合成される。単独のヘモグロビンが血管収縮・血圧上昇の副作用があるのに対し、ヘモグロビン小胞体はそのような副作用はない。大きさは約250ナノメートル。土田名誉教授は2007年ごろには実用化できると考えている。



ヘモグロビン不要の人工赤血球

土田名誉教授らが開発を進める人工赤血球「アルブミンヘム」。遺伝子組み換えアルブミン（血しょうタンパク質）に、酸素と結合する合成ヘム（赤色の部分）を加えてつくる。ヘモグロビンなしでも赤血球の役割を果たせることを示した画期的な人工赤血球である。約8ナノメートルと小さく、血管収縮・血圧上昇の副作用もないという。土田名誉教授は2010年ごろに実用化できると考えている。



人工赤血球を投与した後の血管内部

マウスなどの赤血球やヘモグロビン小胞体の補充は実用とはことなる。

「先生方の研究を美用化する、二十一年に一度のチャンスにあたった」。オキシジェニクスの高木智史社長は目を輝かせる。二〇〇四年の三月に二プロと共同で、長期保存できる人工酸素運搬体の量産技術の開発に成功。〇六年からの臨床試験と、その先の商業ベースでの利用が見えてきた。

オキシジェニクスは〇二年、人工酸素運搬体を事業化するため設立された。人工酸素運搬体は、血中から取り出したヘモグロビンを、直径二五ナノ（ナノは十億分の一）の脂質の膜（リポソーム）でくるんだ構造。血

液型に関係なく輸血で研究グループの持つ、生体内の薬剤などの働きを観測する技術を組み合わせた。有望な二つの技術だったが、商用ベースに乗るには臨床試験などで長い時間がかかる。そこでベ

ンチャー設立支援のバイオXから高木氏ほか六人が出向。資金調達や製薬会社との提携を支援することになった。高木氏が医療の世界に足を踏み入れたのは一九八五年。グレン製薬に入社し、九五年からは社

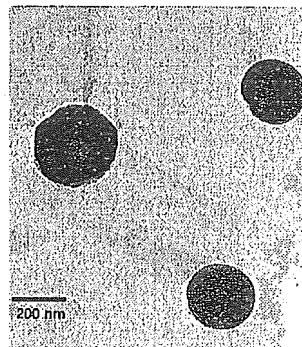
社向けに再構築し、商用が不要な研究用試薬としての展開や、今後成長が品局（FDA）への申請する。

酸素運搬体、実用化へ

バイオ新世代

オキシジェニクス

《会社概要》
▽所在地 港区虎ノ門4-1-1 虎ノ門パストラル本館6階
▽社長 高木智史氏
▽資本金 5億4876万円
▽売上高 4000万円
(2004年12月期)
▽売上高目標 15億円
(2007年12月期)



オキシジェニクスが開発した人工酸素運搬体（透過型電子顕微鏡で撮影）

わり、二〇〇一年にバ

「記者の目」
開発候補絞り
資源投下を
早大理工学部と慶大医
学部の技術をもとに設立
されたオキシジェニクス。人工酸素運搬体のほ
かにも、技術の用途が広
がってきた。「医工連携
による技術の組み合わせ
を、ビジネスの専門家が
課題だ。（関根晋作）

大塚製薬との契約に成功した。リポソームの幹細胞の培養液としての利用が見込めるとい

見込める再生医療分野で

可能性は広がるが、成

功を左右するのは人工酸

素運搬体の実用化だ。〇

六年予定の米国での治験

は、あくまで自社で実施

する構え。「米食品医薬

高木氏はきょうも、奔走