

contribute to the increase in vascular endothelial permeability that develops in reexpanded lungs.

In patients with reexpansion pulmonary edema, the concentrations of neutrophil chemoattractant, such as IL-8 and leukotriene B₄, are increased in edema fluid and are accompanied by higher numbers of pulmonary neutrophils (19, 31). In addition, the administration of antioxidants before lung reexpansion mitigates the development of edema, supporting the hypothesis that reactive oxygen species produced by pulmonary neutrophils may play important roles in the development of reexpansion pulmonary edema (12). In our study, neutrophils accumulated together with a rise in BAL fluid neutrophil elastase activity and MDA concentration, which reflects lipid peroxidation caused by reactive oxygen species in the reexpanded lung (Figs. 6 and 7 and Table 2). These observations suggest that fluid mediators released from activated neutrophils, such as elastase and/or reactive oxygen species, contribute to the development of lung reexpansion injury.

Several studies, including ours, suggest that reexpansion pulmonary edema is associated with an increase in pulmonary vascular endothelial permeability (20, 24, 40). However, few have examined the alveolar epithelial permeability in this disorder. Pulmonary edema often develops rapidly after reexpansion, and the protein concentration in edema fluid is increased (17, 19, 31), suggesting a concomitant increase in epithelial permeability. Injury to the alveolar epithelial barrier markedly influences the severity of ALI (38). By modifying the method of Smedira et al. (30) and Wiener-Kronish et al. (39), we were able to examine the epithelial permeability in reexpanded lungs by measuring the bidirectional flux of ¹²⁵I-albumin through the alveolar septal barrier. We found that both the B/P and PL index were increased, which is consistent with an increase in epithelial permeability in the reexpanded lung. The simultaneous increase in vascular endothelial and alveolar epithelial permeability is likely to be the source of severe and acute disease manifestations at the very onset of reexpansion pulmonary edema. Because the PL index began to rise immediately after reexpansion (Fig. 4), the increase in epithelial permeability may occur immediately after reexpansion. It has been reported that alveolar epithelium is more resistant to injury than the pulmonary vascular endothelium (26). The immediate increase in PL index after reexpansion may be an indication that the mechanical stretch of the alveolar epithelial barrier plays a role in the increased epithelial permeability of the reexpanded lung (Fig. 4).

Y-27632 interacts with ROCK in human neutrophils to suppress the production of superoxide and the chemotactic peptide-induced cell motile function in vitro (14, 21). In the rat liver, Y-27632 attenuated ischemia and reperfusion injury by limiting the infiltration by neutrophils and rise in tissue MDA concentration (32). However, in the present study, pretreatment with Y-27632 did not prevent the accumulation of neutrophils and production of reactive oxygen species in the lung reexpanded after 36 h of collapse. In a preliminary study, we observed neutrophil influx in collapsed lungs before their reexpansion. We also have reported that the production of IL-8 by macrophages and alveolar epithelial cells, which plays an important role in the migration of neutrophils in reexpanded lungs, starts at the time of lung collapse (20). Treatment instituted immediately before reexpansion may be insufficient to inhibit recruitment and activation of neutrophils.

The increase in microvascular permeability is associated with the formation of an endothelial paracellular gap. An actin-myosin contraction of the endothelial cells is important to the regulation of paracellular gap formation (8, 28). It has been reported that the small GTPase Rho plays an important role in the regulation of actomyosin contractile elements (27, 33). Rho and its downstream effector, ROCK, are involved in signal transduction in endothelial cells, linking extracellular stimuli to a dynamic rearrangement of cytoskeletal actin (33). The activation of Rho, via the action of ROCK, causes the phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin light chain phosphatase, inactivating the latter and increasing the phosphorylation of myosin light chains, actomyosin contraction, and endothelial cell barrier dysfunction (1, 5, 16). In a cultured cell model of thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction, the ROCK inhibitor Y-27632 decreases endothelial hyperpermeability and suppresses the reorganization of F-actin and the formation of intercellular gaps (37). Chiba et al. (2) also reported a suppressive effect of Y-27632 on H₂O₂-induced pulmonary edema in isolated rabbit lungs. In cultured pulmonary endothelial cells, MLCK contributes to H₂O₂-induced actin rearrangement (43). These observations suggest that the Rho/ROCK pathway is involved in the increased vascular endothelial permeability induced by reactive oxygen species. In this study, Y-27632 attenuated significantly both the increase in endothelial permeability and the reorganization of F-actin. These observations suggest that Y-27632 downregulates the Rho/ROCK signal transduction pathway in endothelial cells and suppresses the hyperpermeability induced by reactive oxygen species in the reexpanded lung by inhibiting the reorganization of F-actin, subsequently blocking the contraction of vascular endothelial cells. In addition, Rho protein regulates the epithelial tight junction and perijunctional actin organization (6, 22). Y-27632 may influence epithelial cells by protecting the cellular barrier, although this was not examined in the present study.

In summary, this is the first report of the involvement of the Rho/ROCK-mediated pathway in the increase in pulmonary vascular endothelial and alveolar epithelial permeability in reexpansion pulmonary edema. Y-27632 may be effective in treating reexpansion pulmonary edema and other types of ALI associated with an increase in alveolar barrier permeability.

GRANTS

This work was supported, in part, by Grant-in-Aid 11770744 for Fundamental Scientific Research from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan (to M. Sawafuji).

REFERENCES

1. Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura, and Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275: 1308–1311, 1997.
2. Chiba Y, Ishii Y, Kitamura S, and Sugiyama Y. Activation of Rho is involved in the mechanism of hydrogen-peroxide-induced lung edema in isolated perfused rabbit lung. *Microvasc Res* 62: 164–171, 2001.
3. Childress ME, Moy G, and Mottram M. Unilateral pulmonary edema resulting from treatment of spontaneous pneumothorax. *Am Rev Respir Dis* 104: 119–121, 1971.
4. Dull RO, Jo H, Sill H, Hollis TM, and Tarbell JM. The effect of varying albumin concentration and hydrostatic pressure on hydraulic conductivity and albumin permeability of cultured endothelial monolayers. *Microvasc Res* 41: 390–407, 1991.
5. Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, and Aepfelbacher M. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho

- and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 21867–21874, 1998.
6. Fujita H, Katoh H, Hasegawa H, Yasui H, Aoki J, Yamaguchi Y, and Negishi M. Molecular decipherment of Rho effector pathways regulating tight-junction permeability. *Biochem J* 346: 617–622, 2000.
 7. Garcia JG, Siflinger-Birnboim A, Bizios R, Del Vecchio PJ, Fenton 2nd JW, and Malik AB. Thrombin-induced increases in albumin permeability across the endothelium. *J Cell Physiol* 128: 96–106, 1986.
 8. Garcia JG, Davis HW, and Patterson CE. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: Role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 163: 510–522, 1995.
 9. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yaden JC, and Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11: 1176–1183, 1998.
 10. Ishizaka A, Hasegawa N, Sakamaki F, Tasaka S, Nakamura H, Kishikawa K, Yamada A, Obata T, Sayama K, Urano T, and Kanazawa M. Effects of ONO-1078, a peptide leukotriene antagonist, on endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 1325–1331, 1994.
 11. Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, and Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* 5: 221–225, 1999.
 12. Jackson RM, Veal CF, Alexander CB, Brannen AL, and Fulmer JD. Re-expansion pulmonary edema. A potential role for free radicals in its pathogenesis. *Am Rev Respir Dis* 137: 1165–1171, 1988.
 13. Kanazawa M, Hasegawa N, Urano T, Sayama K, Tasaka S, Sakamaki F, Nakamura H, Waki Y, Terashima T, Fujishima S, and Ishizaka A. Regional lung hematocrit variation and assessment of acute lung injury. *J Appl Physiol* 77: 567–573, 1994.
 14. Kawaguchi A, Ohmori M, Harada K, Tsuruoka S, Sugimoto K, and Fujimura A. The effect of a Rho kinase inhibitor Y-27632 on superoxide production, aggregation and adhesion in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Pharmacol* 8: 203–208, 2000.
 15. Khimenko PL, Moore TM, Wilson PS, and Taylor AE. Role of calmodulin and myosin light-chain kinase in lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 271: L121–L125, 1996.
 16. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Ogawa K, Iwamatsu A, and Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245–248, 1996.
 17. Mahfood S, Hix WR, Aaron BL, Blaes P, and Watson DC. Reexpansion pulmonary edema. *Ann Thorac Surg* 45: 340–345, 1988.
 18. Matsuura Y, Nomimura T, Murakami H, Matsushima T, Kakehashi M, and Kajihara H. Clinical analysis of reexpansion pulmonary edema. *Chest* 100: 1562–1566, 1991.
 19. Nakamura H, Ishizaka A, Sawafuji M, Urano T, Fujishima S, Sakamaki F, Sayama K, Kawamura M, Kato R, Kikuchi K, Kanazawa M, Kobayashi K, and Kawashiro T. Elevated levels of interleukin-8 and leukotriene B4 in pulmonary edema fluid of a patient with reexpansion pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 1037–1040, 1994.
 20. Nakamura M, Fujishima S, Sawafuji M, Ishizaka A, Oguma T, Soejima K, Matsubara H, Tasaka S, Kikuchi K, Kobayashi K, Ikeda E, Sadick M, Hebert CA, Aikawa N, Kanazawa M, and Yamaguchi K. Importance of interleukin-8 in the development of reexpansion lung injury in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1030–1036, 2000.
 21. Niggli V. Rho-kinase in human neutrophils: a role in signaling for myosin light chain phosphorylation and cell migration. *FEBS Lett* 445: 69–72, 1999.
 22. Nusrat A, Giry M, Turner JR, Colgan SP, Parkos CA, Carnes D, Lemichez E, Boquet P, and Madara JL. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10629–10633, 1995.
 23. Parker JC. Inhibitors of myosin light chain kinase and phosphodiesterase reduce ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol* 89: 2241–2248, 2000.
 24. Pavlin DJ, Nessly ML, and Cheney FW. Increased pulmonary vascular permeability as a cause of reexpansion edema in rabbits. *Am Rev Respir Dis* 124: 422–427, 1981.
 25. Phillips PG and Tsan MF. Direct staining and visualization of endothelial monolayers cultured on synthetic polycarbonate filters. *J Histochem Cytochem* 36: 551–554, 1988.
 26. Pittet JF, Matthay MA, Pier G, Grady M, and Wiener-Kronish JP. Pseudomonas aeruginosa-induced lung and pleural injury in sheep. Differential protective effect of circulating versus alveolar immunoglobulin G antibody. *J Clin Invest* 92: 1221–1228, 1993.
 27. Ridley AJ and Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389–399, 1992.
 28. Shasby DM, Shasby SS, Sullivan JM, and Peach MJ. Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability. *Circ Res* 51: 657–661, 1982.
 29. Shimizu Y, Dobashi K, Iizuka K, Horie T, Suzuki K, Tukagoshi H, Nakazawa T, Nakazato Y, and Mori M. Contribution of small GTPase Rho and its target protein ROCK in a murine model of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 210–217, 2001.
 30. Smedira N, Gates L, Hastings R, Jayr C, Sakuma T, Pittet JF, and Matthay MA. Alveolar and lung liquid clearance in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 70: 1827–1835, 1991.
 31. Suzuki S, Tanita T, Koike K, and Fujimura S. Evidence of acute inflammatory response in reexpansion pulmonary edema. *Chest* 101: 275–276, 1992.
 32. Takeda K, Jin MB, Fujita M, Fukai M, Sakurai T, Nakayama M, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Furukawa H, and Todo S. A novel inhibitor of Rho-associated protein kinase, Y-27632, ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Surgery* 133: 197–206, 2003.
 33. Tapon N and Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9: 86–92, 1997.
 34. Tasaka S, Ishizaka A, Urano T, Sayama K, Sakamaki F, Nakamura H, Terashima T, Waki Y, Soejima K, Oyamada Y, Fujishima S, and Kanazawa M. BCG-priming enhances endotoxin-induced acute lung injury independent of neutrophils. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 1041–1049, 1995.
 35. Taylor AE and Drake RE. Fluid and protein movement across the pulmonary microcirculation. In: *Lung Water and Solute Exchange*, edited by Staub NC. New York, NY: Dekker, 1978 p. 129–182.
 36. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, and Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389: 990–994, 1997.
 37. van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, and van Hinsbergh VW. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyper permeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinase. *Circ Res* 87: 335–340, 2000.
 38. Ware LB and Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334–1349, 2000.
 39. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh J, Pittet JF, Frank D, Dobbs L, Vasil ML, and Matthay MA. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute P aeruginosa pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 75: 1661–1669, 1993.
 40. Wilkinson PD, Keegan J, Davies SW, Bailey J, and Rudd RM. Changes in pulmonary microvascular permeability accompanying reexpansion oedema: evidence from dual isotope scintigraphy. *Thorax* 45: 456–459, 1990.
 41. Yonemaru M, Kasuga I, Kusumoto H, Kiyokawa H, Kuwabara S, Ichinose Y, and Toyama K. Protein kinase inhibitor attenuates an increase in endothelial monolayer permeability induced by tumor necrosis factor- α . *Respirology* 2: 63–69, 1997.
 42. Yoshimura K, Nakagawa S, Koyama S, Kobayashi T, and Homma T. Roles of neutrophil elastase and superoxide anion in leukotriene B4-induced lung injury in rabbit. *J Appl Physiol* 76: 91–96, 1994.
 43. Zhao Y and Davis HW. Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells. *J Cell Physiol* 174: 370–379, 1998.

人工血液の現在と将来

小林 紘一*

はじめに

輸血用血液製剤はヒトの血液の全部、またはヒトの血液から赤血球、血小板および血漿といった成分を分離、調整し、病気や怪我で手術を必要とする人たちの治療に使用され大きな効果をあげている。一方、医工学の進歩は、緊急時に対応でき同種血輸血を回避できるような人工血液の開発を可能としている。

本稿では、そのうち人工赤血球(人工酸素運搬体)と人工血小板について述べる。

I 人工赤血球(人工酸素運搬体)

現在、臨床の場で行われている赤血球輸血はヒトの血液型を規定する免疫学的機序に厳密に従うことにより有効で安全な治療手段となっており、医療の進歩に大きな貢献をしている。しかし、赤血球製剤の保存期間は21日と限界があり、また厳密な核酸増幅検査(NAT)を経てもなお、ウイルスなどの感染の危険性が危惧されている。頻度は低いですが、急性・慢性の副作用が報告されている。また人口の高齢化と少子化を迎えて現行の血液供給体制に不安定な面もある。

使用にあたって血液型を考慮せずに投与でき、また保存も容易な人工酸素運搬体が開発されれば人類の健康維持にとって有用である。

現在までに開発された人工酸素運搬体には表1、図1のようなものがある^{1,2)}。

わが国では、パーフルオロカーボン乳剤とヒトのヘモグロビン(Hb)を polyethylene glycol

表1. 人工酸素運搬体

- ・ Hb based oxygen carrier modified Hb(修飾 Hb)
 - 分子内架橋: DCL Hb
 - 分子修飾: PEG Hb
 - 分子間架橋: Hb raffimer, poly-Hb hemoglobin vesicle(HbV)
- ・ PFC(perfluorochemicals)

(PEG)で修飾した modified Hb(修飾 Hb)の開発は、人工酸素運搬体として1970年代に研究が着手されたが、その後進展をみていない。現在、輸血代替物として開発されつつあるヒト由来の人工酸素運搬体は、期限切れ赤血球から精製した Hb を再生した血液製剤であり、備蓄と安定供給を可能にし、輸血を補完する新しい医療として期待されている。

Hb を利用する人工酸素運搬体には、修飾 Hb と脂質膜に Hb を内包した Hb vesicle(HbV) の2種類がある。欧米では、Hb を架橋などして作製した修飾 Hb の開発が中心であり、臨床試験の段階にあるものもある。修飾 Hb は acellular Hb とも呼ばれているが、粒子が小さいため血管内皮に近接し血管内皮から産生されている一酸化窒素(NO)を容易に結合し血圧が上昇するという副作用が指摘され、開発を中断されたものもある(表2)²⁾。

他方、われわれは高分子科学と分子集合科学の応用により高濃度の精製 Hb 溶液をリン脂質小胞体(リポソーム)に内包し、リポソーム製剤としての性質と酸素運搬体としての役割を合せもつ、

* K. Kobayashi(教授): 慶應義塾大学呼吸器外科。

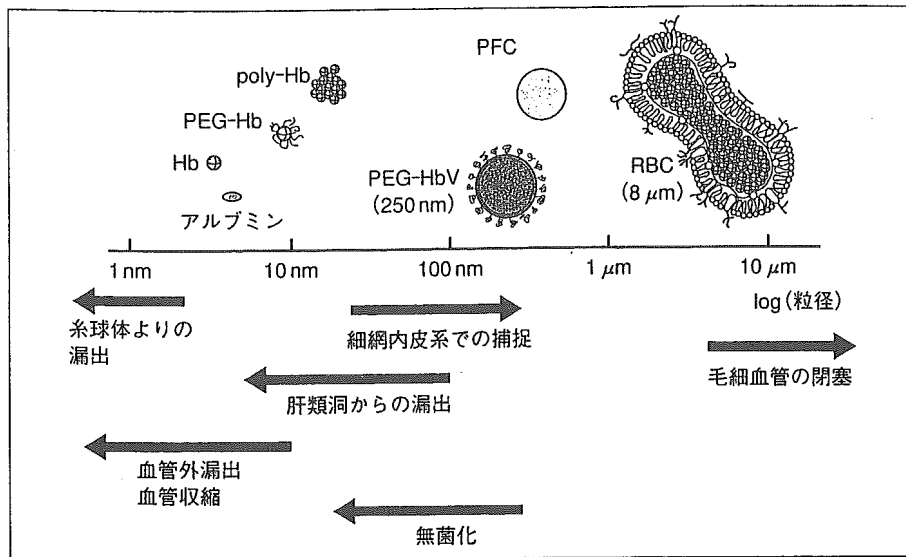


図1. 各種人工酸素運搬体

表2. 修飾Hbの開発動向(2004年7月現在)

修飾Hb (会社名)	成分	適応	臨床試験(状況)
PolyHeme (Northfield Lab. 社)	グルタルアルデヒド重合 ヒトHb	外傷出血時の 輸血代替	第III相(米国)
Hemopure (Biopure 社)	グルタルアルデヒド重合 ウシHb	術中輸血代替	第III相(米国) (南アフリカで認可)
PHP (Curacyte 社)	ピリドキサル化-PEG 修飾 ヒトHb	敗血症に対する 循環動態安定化	第II相(米国)
Hemospan (Sangart 社)	PEG-修飾ヒトHb	術中輸血代替	第II相(スウェーデン)
Hemolink (Hemosol 社)	o-ラフィノーズ重合 ヒトHb	術中輸血代替	第II, III相 (米国/英国/カナダ)
PEG-Hb (Enzon 社)	PEG-修飾ウシHb	腫瘍組織酸素化	開発中止(米国, 1997年)
HemAssist (Baxter 社)	α - α 鎖間分子内架橋ヒトHb	外傷出血時の 輸血代替	開発中止(米国, 1998年) (血管収縮)
Optro(rHb1.1) (Somatogen 社)	リコンビナントヒトHb (分子内架橋型)		開発中止(米国, 1998年) (血管収縮)
rHb2.0 (Baxter 社)	リコンビナントHb (低NO親和度, PEG結合)		開発中止(米国, 2003年) (血管収縮)

まったくの新しい製剤であるHbVを精製した^{1,2)}。
このHbVは、直径は250 nmでcellular Hbとも呼ばれており、先に述べた修飾Hbのもつ血圧

上昇などのHb分子自体の副作用を解決している。赤血球構造の生理的意義に基づくと、リン脂質膜でHbをおおったHbVがより適した構造で

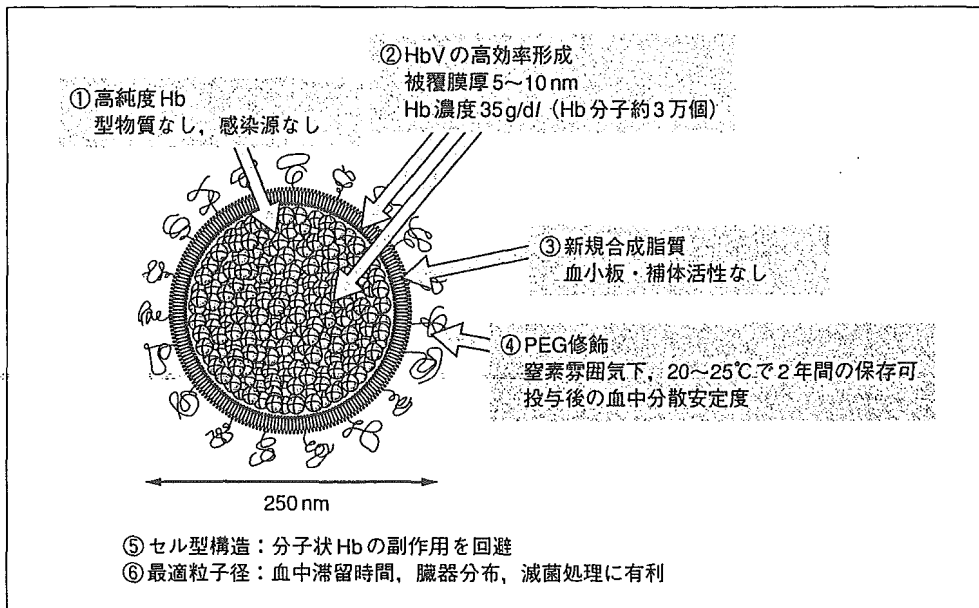


図2. HbVの特徴

あることは理解されているが、高純度のHbを十分量内包し、脂質二重膜を制御し、効率よく小胞体を作製する技術は早稲田大学の土田英俊氏(早稲田大学理工学部・現名誉教授)らによって開発され、1997年より厚生労働省科学研究としてわれわれとの研究開発が続けられている。HbVは、諸物性値を血液と同等に調節ができ、さらには感染源や血液型がなく、長期保存が可能であり、小粒径であるために赤血球が通過できない狭窄部位を通過できるなどの特徴をもち合せている。安定性や効率を高めるために、図2のように表面をPEGで修飾するなどいろいろな工夫がなされている²⁾。

以下にわれわれのHbVについての安全性や有効性についてのデータを示す。

われわれは呼吸器外科学の立場から本製剤にて血液の大半を交換後、肺におけるガス交換機能、酸素運搬量と循環動態の恒常性を確認する試験を行い、組織への十分な酸素運搬機能を実証した。この製剤の安全性に関して、ラットの静脈内負荷(15~35%)単回投与では、食食機能の推移とともに1週間以内に完全に代謝されることを確認し

ている³⁾。また血液生化学検査方法論を確立し⁴⁾、詳細な安全性情報を得ている⁵⁾。鉄代謝に関しては、生理的代謝経路に沿うことを確認している。免疫学的変化、凝固系での異常も認めず、急性期投与での障害も認めていない。また、出血ショック蘇生液としての効果^{6,7)}のみならず、体外循環回路の補充液⁸⁾、液体換気、腫瘍組織酸素化⁹⁾にも有効であることを実証し、新しい適応の可能性を提示した。カニクイザルへの負荷投与試験でも問題となる所見を認めていない¹⁰⁾。出血性ショック(ビーグル犬)に対し、HbVの投与は輸血と同等の蘇生効果を示し、急性期の有効性を証明した。さらに、循環血液量の40%を置換した後、Htが1週間以内に支障なく回復する過程を確認し、30項目の血液生化学試験で脂質代謝物の一過性の上昇以外は正常値を推移したこと¹¹⁾、ラット反復投与試験(10 ml/kg/日、14日間)で免疫系、凝固系への影響を含む生体諸機能に関する予備的試験を終了し、問題所見をまったく認めていない¹²⁾。図3、4はラットにおけるHbVによる90%交換輸血実験を示している。1 ml/分で脱血しHbVを5%のリコンビナントアルブミンに分散し

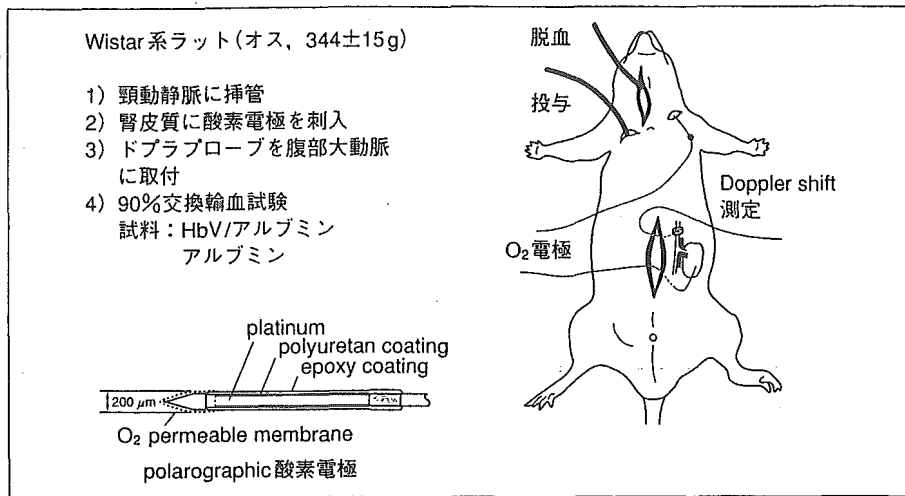


図3. HbVによる90%交換輸血試験

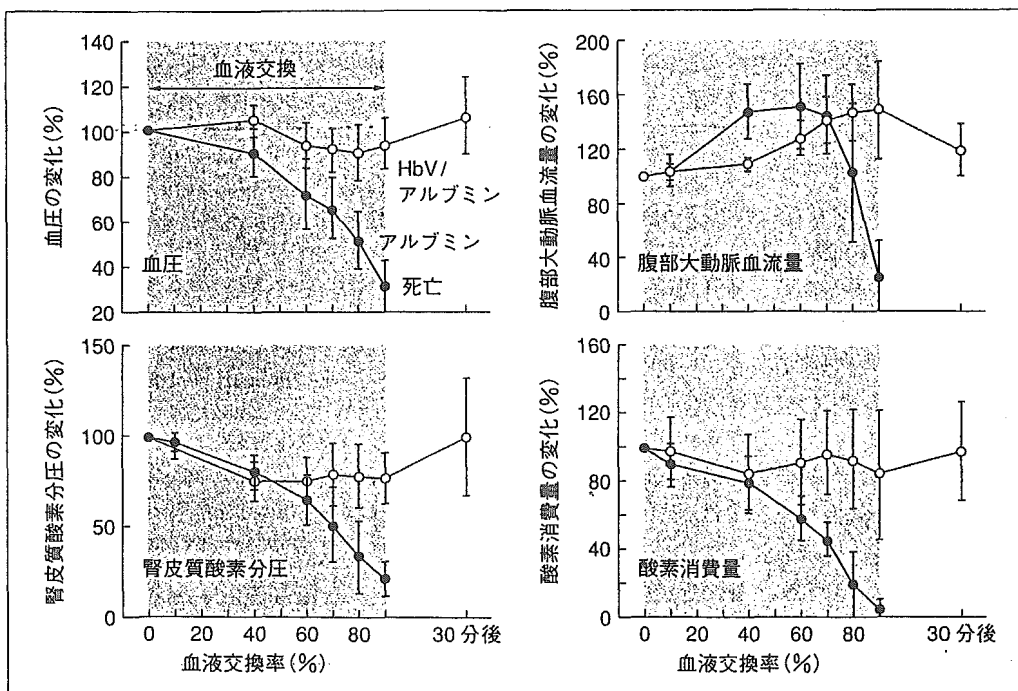


図4. HbVによる90%交換輸血試験

た群とリコンビナントアルブミンのみを投与した群の経過をみると、HbVとリコンビナントアルブミンを投与した群は生存するが、リコンビナントアルブミン群のみの群では死亡しており、

HbVが酸素運搬体の機能を果たしていることが確認された¹³⁾。

われわれは、以上のような安全性と有効性に関するデータをもとに臨床治験を開始すべく準備を

表3. 人工酸素運搬体の臨床応用

<ul style="list-style-type: none"> ・ 出血ショック時の蘇生液 ・ 術中出血時の投与 ・ 体外循環回路の補填液 ・ 慢性貧血患者への投与 ・ 酸素治療薬 (微小循環の改善, 虚血性疾患の治療, 抗腫瘍効果増強, 移植臓器保存液など)
--

すすめている。

人工酸素運搬体は出血性ショックの治療ばかりでなく表3のような病態にも利用できると考えられ、その有効性につき検討を行っている。

なお、酸素運搬作用をもつヘムを合成し、これをアルブミン(将来的にはリコンビナントアルブミン)の構造の中に包接し、膠質浸透圧をもった resuscitation fluid としての機能を期待したアルブミンヘムの開発も進行中である^{14,15)}。

III 人工血小板

血小板製剤は、保存可能な時間が短い(72時間)、週末などに入手困難、ウイルス感染や発熱などの反応を伴うことがある、生体内での寿命が短いので頻回投与が必要なことが多い、濃厚血小板の使用量が増加の傾向にあるなどの理由で止血を目的とした人工血小板の開発が行われている。

人工血小板に求められている機能は出血部位で内皮下組織が露呈された部位にのみ作用し、効率よく血栓を形成し、出血をコントロールすることであり、組織の修復後には血栓は溶解し、吸収されなければならない。人工血小板開発の基本は膜受容体蛋白とそれらを運ぶ担体にこれを固相化することで、膜受容体蛋白としてはフォンビルブランド因子(vWF)の受容体であるGP1b/IXや凝集に必要なGP1b/IIIaなどが、また膜受容体蛋白の担体としてはリポソーム、ヒアトアルブミンや赤血球などが考えられている。

現在開発されつつある人工血小板としては、以下のようなものがある。Fibrinogen-RBC, thromboerythrocyte, plateletsome, infusible

platelet membrane (IPM), throbosphere, γ GPI α -liposome, γ GPI α /IIA を導入したアルブミン重合体などであるが、詳細については文献を参照されたい^{16,17)}。

おわりに

科学の進歩により、安全で有効性の高い人工的に製造された血液代替物が臨床の場で応用される日がくることを期待したい。

文 献


- 1) Kobayashi K, Horinouchi H, Watanabe M et al : Safety and efficacy of hemoglobin-vesicles and albumin-hemes. Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine, Vol.12, ed by Kobayashi K, Springer-Verlag, 2005
- 2) 土田英俊, 宗慶太郎, 酒井宏水ほか: 酸素輸液(人工赤血球)の安全度と体組織への酸素供給. 麻酔52 [増刊]: S55-66, 2003
- 3) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K et al : Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers ; influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial systems. Am J Pathol 159 : 1079-1088, 2001
- 4) Sakai H, Tomiyama K, Masada Y et al : Pretreatment of serum containing Hb-vesicles(oxygen carriers) to avoid their interference in laboratory tests. Clin Chem Lab Med 41 : 222-231, 2003
- 5) Sakai H, Horinouchi H, Masada Y et al : Metabolism of hemoglobin-vesicles(artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. Biomaterials 25 : 4317-4325, 2004
- 6) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H et al : Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. Crit Care Med 32 : 539-545, 2004
- 7) Yoshizu A, Izumi Y, Park S et al : Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier hemoglobin vesicle(HbV) maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor alpha(TNF α). ASAIO J 50 : 458-463, 2004

- 8) 山崎真敬, 饗庭 了, 四津良平: 人口赤血球を用いた人工心肺充填液の feasibility test. 人工血液 12: 45, 2004
- 9) Kobayashi K, Komatsu T, Iwamaru A et al: Oxygenation of hypoxic region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. J Biomed Mater Res A 64: 48-51, 2003
- 10) 高木智史, 大村光代, 太田勝次ほか: ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸液としての医療応用. 人工血液 13: 29-33, 2005
- 11) Sakai H, Horinouchi H, Yamamoto M et al: Acute 40% exchange transfusion with Hb-vesicles (HbV) suspended in recombinant HSA solution; degradation of HbV and erythropoiesis in rat spleen observed for 2 weeks. Transfusion [in press]
- 12) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H et al: Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. J Pharmacol Exp Ther 311: 874-884, 2004
- 13) Sakai H, Takeoka S, Park SI et al: Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effect on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. Bioconjug Chem 8: 23-30, 1997
- 14) Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y et al: Human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)-phenylporphyrinatoiron(II) derivative as a totally synthetic O₂-carrying hemoprotein. Bioconjug Chem 10: 797-802, 1999
- 15) Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E: Kinetics of CO- and O₂-binding to human serum albumin-heme hybrid. Bioconjug Chem 11: 772-776, 2000
- 16) 村田 満: 人工血小板の開発—現状と将来展望. 分子細胞治療 3: 618-624, 2004
- 17) 半田 誠: 人工血小板代替物(人工血小板). 日本人工臓器学会第18回教育セミナー, p77-83, 2002

*

*

*




■B6変型判・436頁 2005.7.
定価5,145円(本体4,900円+税5%)
ISBN4-524-24078-0

当直医実戦マニュアル

改訂第4版

●総合監修 亀岡信悟 (東京女子医科大学教授) ●編集主幹 梅田悦生・滝口 進

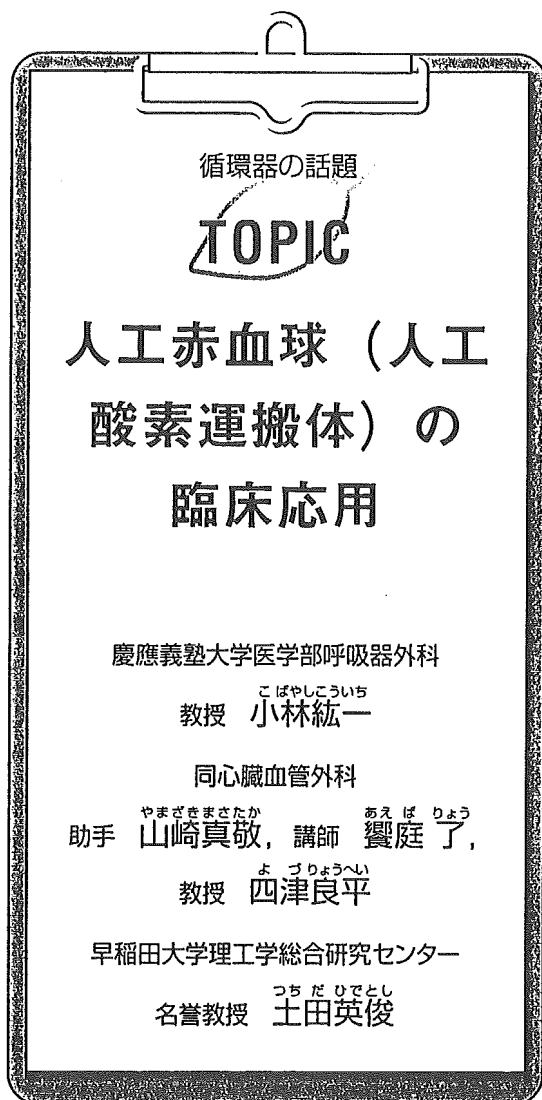
夜間に専門外の症例に遭遇しても適切に対処できるよう、「実戦的」なノウハウを盛り込んだ当直医の必携書。「症状からの対応」「よく遭遇する傷病」を二本柱とし、数多くの対処法・薬剤処方・小児に特別な対応などを呈示。進歩・変化の著しい薬剤の用法・用量をすべて見直し、収載薬品メーカーの協力を得て、適応外使用の大幅な修正や市場占有率が高いものの追加など、最新情報を提供。



南江堂

〒113-8410 東京都文京区本郷三丁目42-6
(営業) TEL 03-3811-7239 FAX 03-3811-7230
《<http://www.nankodo.co.jp>》

0511t



POINT

- 使用に際し、血液型の判定（クロスマッチ）が必要なく、ウイルスなどの感染の危惧のない、室温で保存可能な人工酸素運搬体が開発されつつある。1つは赤血球よりヘモグロビンのみを回収しこれを脂質二重膜の中に包埋したヘモグロビン小胞体であり、もう1つは合成したヘムをリコンビナントアルブミンに包接させた完全合成系のアルブミン-ヘムである。これらは出血性ショックの際の使用ばかりでなく、人工心肺の補填液、臓器保存液、血液希釈、狭窄した血管の末梢への酸素運搬、固形腫瘍の放射線療法や化学療法に対する増感作用などの効果が期待される。

はじめに

血液は赤血球、白血球および血小板の血球分画と、アルブミン、凝固因子などを含む血漿成分から構成され、それぞれ順に、酸素運搬、殺菌作用、止血、栄養の運搬、血液凝固など実に多彩な機能を持っている。これらすべての役割を代替する人工物を実現することは不可能に近いが、酸素運搬のみに焦点を絞った人工赤血球（人工酸素運搬体）の研究は、近年になってわが国でかなりの成果が得られ、臨床応用を目指した取り組みが具体化している。

人工酸素運搬体としての条件は、赤血球と同等の酸素運搬機能を有するのはもちろん、血液型がなく、ウイルスなどによる感染が起こる危惧もなく、また、長期間の保存が可能なことなどである。従って、緊急時にいつでもどこでも必要に応じて使用でき、また、血液型不一致の異型輸血事故も回避できる。さらに肝炎やエイズ（後天性免疫不全症候群）をはじめ、輸血を介して伝播する「新感染症」の危険性もなくなる。少子高齢化で献血量の減少が危惧される中、人工赤血球の実現に対する期待がこれまで以上に高まってきている。

1. 人工酸素運搬体の開発（図1）

血液の中で、水（血漿分画）の酸素溶解度はごくわずかである。必要な酸素は赤血球中に高濃度に存在するヘモグロビン（Hb）に結合された形で肺から末梢組織に運搬される。この役割を代替する人工酸素運搬体としては、これまでに以下の2つが主に開発されてきた。1つは、水よりも高い酸素溶解能を持つ溶液、パーフルオロケミカルズ（perfluorochemicals；PFCs）¹⁾で、もう

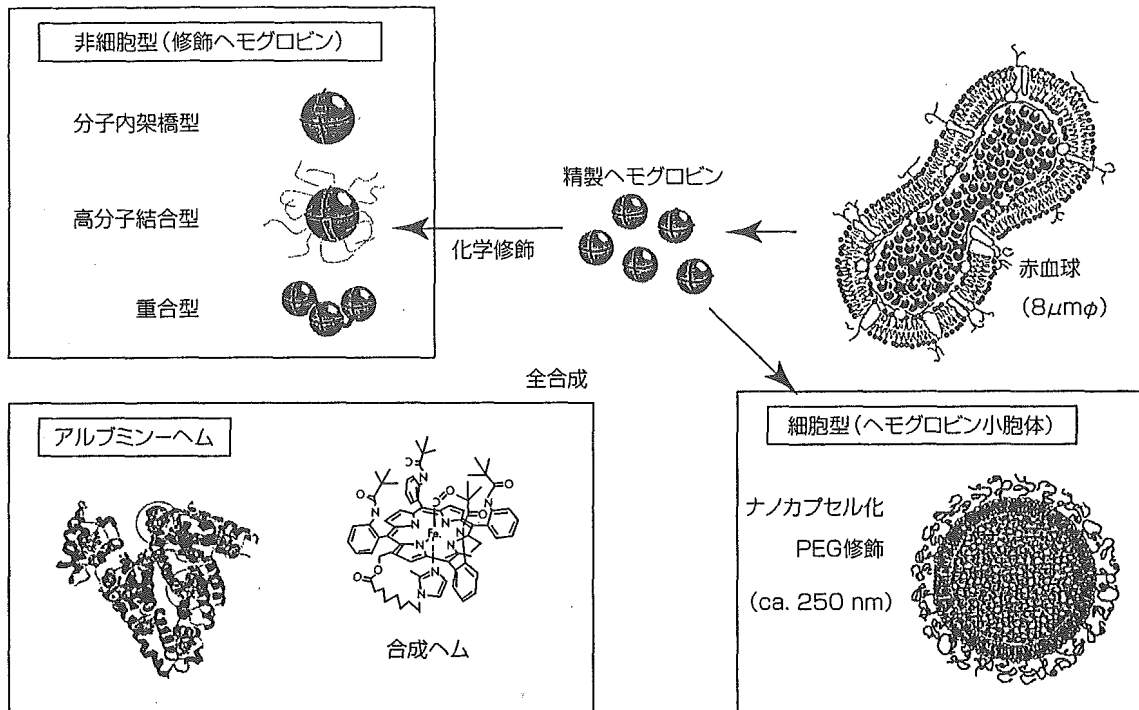


図1 人工酸素運搬体の開発

血液の多様な機能のうち、酸素運搬のみに焦点を絞った人工酸素運搬体の開発は主に1960年代から行われ、現在に至るまでさまざまな種類が開発された。欧米では、高純度ヘモグロビンに化学修飾を加えた非細胞型の人工酸素運搬体の開発が行われているが、副作用も指摘されている。他方、ヘモグロビンをリン脂質の二分子薄膜で包み込んだヘモグロビン小胞体は、赤血球と類似の細胞型構造が特徴である。合成ヘムを組み換えヒト血清アルブミンに包接させたアルブミン-ヘムは、大量生産のできる完全合成系酸素輸液である（p.6にカラー写真掲載）

1つは、ヒトの赤血球から精製単離したヘモグロビンを利用したものである。

PFCsは有機フッ素化合物で、酸素を水の数十倍も溶解できる透明な溶液である。これに脂質を加え水相中で乳化して得られる分散液（PFC乳剤）は、わが国でも人工酸素運搬体として開発が進められ、臨床使用されたこともあったが、酸素運搬能の不足（乳化する必要がありその濃度が薄まるため使用に当たって酸素吸入が必要）や体内蓄積などのために最終的には製造が中止されている。その後、酸素溶解量の

増大や製造技術の向上に伴い、それまでの欠点を補う次世代のPFCも開発されつつある。

赤血球から精製単離したヘモグロビンを使用する場合、そのままでは、酸素親和度が高いため組織で酸素を放出しないことや、ヘモグロビンの基本構造である4つのサブユニット（四量体）の状態から、血中では二量体に解離し、速やかに血中から消失してしまうなどの課題が明らかになった。そこで、ヘモグロビンに直接加工を加え分子量を増大したり、酸素親和度を適度に調節するなどの試みが主に欧米で行われ、これ

らは修飾ヘモグロビンと呼称されている。臨床試験の最終段階にまで到達したものもあるが、臨床試験の過程で粒子が小さいために血管壁に近接し、血管内皮から放出される一酸化窒素（NO）を吸着するため、血管平滑筋の収縮を来し血圧が上昇するなどの副作用に直面し、いまだ臨床応用に至ったものはない^{2, 3)}。他方、ヘモグロビン小胞体は、高純度、高濃度ヘモグロビンを脂質二分子膜で被覆し、平均粒径250nmの小胞体とすることにより、赤血球と類似の細胞構造としたものである。また、合成ヘムを組み換えヒト血清アルブミンに包接させたアルブミン-ヘムは、生理条件下で、可逆的に酸素を結合できる完全合成型の人工酸素運搬体であり、その酸素運搬能は天然のヘモグロビンに匹敵する。ヘモグロビン小胞体とアルブミン-ヘムは、わが国独自の技術として早稲田大学が確立し、体内投与試験による酸素運搬機能と安全性の評価研究が、慶應義塾大学医学部と共同で進められ、げっ歯類を用いた基本的な動物投与試験はほぼ終了し、臨床試験の開始が期待されている^{4, 5)}。

2. 人工酸素運搬体の意義

赤血球の寿命の120日と比較し、人工酸素運搬体の半減期は数日程度と短いため、定期的に赤血球輸血を必要とするような慢性的な貧血に対する臨床応用は現時点では困難と考えられる。さらに、優れた特徴（血液型なし、感染源なし、長期保存可能、小粒径）を活用することにより、赤血球では対応が不可能な症例にも使用することが期待できる。まず、緊急医療に必要不可欠となる輸血代替としての酸素輸液（赤血球代替物）は、次世代医療の最も重要な課題に位置付けられており、災害などの緊急時の出血に際し、

長期備蓄に耐える安全で血液型のない酸素輸液がいつでもどこでも迅速に供給できるようになれば、危機管理対策の大きな進展になる。加えて最近、「自己血輸血の支援」としての使用法が注目されている。術前に患者の自己血液を採取して保存し、代わりに人工酸素運搬体を投与して血液希釈することにより、術中出血による損失を少なくすることも可能となる。術中出血に対しては人工酸素運搬体を投与し、術後に採血しておいた患者の自己血液を戻すものである。このように術前血液希釈液として利用すれば手術中に失われる自分自身の血液量を少なくすることが可能になり、結果的に通常の赤血球輸血が回避できる。

さらに、近年になって人工心肺の充填液として人工酸素運搬体を利用する新しい考え方も生まれた。新生児・乳児の開心術では一般的に人工心肺回路の充填液として輸血が用いられているのが現状で、これは低体重の患者で無輸血充填とした場合、人工心肺の運転中に激しい血液希釈状態となり、臓器とりわけ脳の適正な酸素供給が保証されない。ここで人工酸素運搬体を人工心肺回路の充填液に利用すれば、運転中の血液希釈状態においても適正な酸素供給が可能になると考え、山崎らは現在、動物を用いた体外循環モデルを確立し、その可能性について研究を進めている⁶⁾。

さらに、人工酸素運搬体は赤血球よりも小粒径で粘度も低いことから、赤血球が通り抜けられないような狭い部位でも通過でき、体組織や臓器の迅速な酸素化に有効と考えられる。これは赤血球機能の代替という位置付けではなく、人工酸素運搬体の性質を生かした新たな応用として注目されている。心筋梗塞や脳梗塞では血

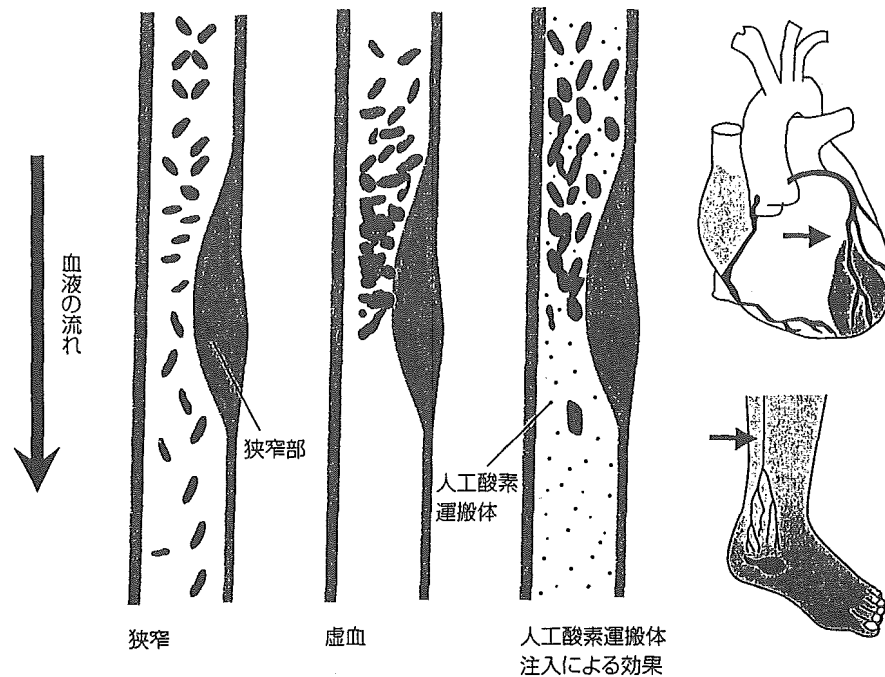


図2 人工酸素運搬体による狭窄血管の末梢への酸素供給

栓で詰まった部位から先には赤血球は到達できず、従って酸素を供給できず虚血性領域となり、その組織は最終的には死に至るが、人工酸素運搬体は狭窄血管あるいは側副経路を経由して、通過できる可能性があり、傷害部位の組織を低酸素から保護し、障害の予防に有用と期待されている^{7, 8)} (図2)。また癌治療薬としての利用も検討されている。一般に腫瘍は低酸素状態であり、放射線照射や抗癌剤治療に対して抵抗性を示す。人工酸素運搬体は赤血球では到達不可能な、血管から離れた腫瘍組織内の低酸素部位にまで酸素を供給することが可能なので、放射線治療や抗癌剤治療への感受性を高めるための検討が行われている⁹⁾。

そのほか臓器移植の際に、摘出臓器の灌流液

として使用すれば、その臓器の保存性が向上すると期待できる。他方では、膜抗原がないことから自己免疫性溶血性貧血への応用、組織再生のための人工臓器細胞培養液としての利用など、その適応範囲はますます拡張している。人工酸素運搬体の完成は、わが国の血液事業の進歩と革新に貢献するばかりでなく、輸血・献血システムの整備が遅れている地域への国際貢献としても極めて重要な意義を持っているのである。

おわりに

人工酸素運搬体の研究は、学際・業際・医工薬の分野を超えた連携の下に強力に推進されて

おり、次世代医療に貢献できる最重要分野に先鞭を付けるべく、世界規模で活発な展開が進められている。わが国でも1997年度より、厚生労働科学研究高度先端医療研究事業「人工血液開発分野」として、「臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究」¹⁰⁾に引き続き、現在は、「人工赤血球の安全性向上に関する研究」および「救急災害医療に利用可能な人工赤血球に関する研究」として推進されている。また、人工赤血球、人工血小板、人工抗体の3部門に分かれた活発な研究展開が進められている。今後、さらなるプロジェクト推進により医療に新しい変革をもたらすことが期待されている。

- in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemoglobin with Hb vesicles and their O₂ affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285, 2003, 1140-7.
- 8) Erni, D. et al. Normovolemic hemodilution with Hb vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284, 2003, H1702-9.
- 9) Kobayashi, K. et al. Oxygenation of hypoxic region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res.* 64 A, 2003, 48-51.
- 10) 土田英俊. 臨床応用可能な酸素輸液（人工赤血球）の創製に関する研究. *人工臓器.* 32 (1), 2003, 29-36.

● 引用・参考文献

- 1) Mitsuno, T. et al. Clinical studies of a per-fluorochemical whole blood substitute (Fiosol-DA) Summary of 186 cases. *Ann Surg.* 195, 1982, 60-9.
- 2) Everse, J. et al. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic Biol Med.* 22, 1997, 1075-99.
- 3) Yeh, LH. et al. Redox side reactions of haemoglobin and cell signaling mechanisms. *J Intern Med.* 253, 2003, 518-26.
- 4) Sakai, H. et al. Synthesis and physico-chemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjug Chem.* 11, 2000, 56-64.
- 5) Takeoka, S. et al. Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation. *Bioconjug Chem.* 13, 2002, 1302-8.
- 6) 山崎真敬. 人工赤血球を用いた人工心肺充填液のfeasibility test. *人工血液.* 12 (2), 2004, 45.
- 7) Contaldo, C. et al. Improved oxygenation

は信じられないほどである。同一遺伝子でも表現型 (Phenotype) が違うのである。その表現型は環境によって左右されるのである。臨床検査データは一つの表現型であり、環境によって変化した結果も含んだデータである。遺伝子多型などの遺伝子情報と標準化された臨床検査データを蓄積し解析することで、個人が置かれた環境等の要因も考慮することができ、初めて個人の体質に合った医療(テーラーメイド医療)が可能になると考えている。このような状況になると医療は劇的に変化するのではないだろうか。

今回 JCCLS にできた臨床検査標準化基本検討委員会は、ここに述べたような手段で臨床検査ひいては医療の標準化の礎になることを目指している活動である。

文 献

- 1) Kinoshita S, Toyofuku M, Iida H, et al: Standardization of laboratory data and establishment of reference intervals in Fukuoka Prefecture: A Japanese perspective. Clin Chem Lab Med 39: 256-262, 2001
- 2) 木下幸子: 生化学項目の標準化(1)―福岡県での実践. 臨床検査 46: 867-875, 2002

*日本臨床化学会会長, JCCLS 臨床検査標準化基本検討委員会委員長, 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学・教授
 ☎812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

人工酸素運搬体の開発 —現状と将来展望—

ほりのうちひろひさ いづみようたろう
 堀之内宏久*1・泉陽太郎*1
 こばやしこういち つちだまいしゆん
 小林紘一*2・土田英俊*3

■ 歴史的背景

1900年にLandsteinerが血液型を発見、血液型を合わせ、交差試験を行うことにより、輸血の副作用は著しく減少した。20世紀、輸血は出血に対するなくてはならない治療法としてその安全性が追求され続け、その結果多くの血液型の理解が進み、輸血感染症が発見され、スクリーニング方法も確立した。また、移植片対宿主疾患(graft versus host disease, GVHD)などの免疫学的異常反応の解析と治療、輸血後急性肺傷害(transfusion related acute lung injury, TRALI)など、多くの問題に対して研究が行われ、その治療法が開発されて、輸血治療は安全・確実なものとなってきた。しかし、未知のウイルス感染症やプリオン病の問題など輸血治療の安全性にかかわる新たな問題が最近クローズアップされてきている。

いつでも、どこでも安全に投与できる人工血液の開発を目指し、厚生省(当時)は1997年に人工赤血球、人工血小板、人工抗体の創製と開発について科学研究班を組織し、精力的な研究が開始され、現在に至っている。

■ 人工赤血球とは

輸血に用いる保存血は冷所で保存し、保存期間が21日間と短いこと、輸血を行う直前に交差試験を必要とすることなどの煩雑な点がある。交差試験が必要なく、長期保存のできる人工赤血球の開発は第二次世界大戦以前より始まっていた。戦後、パーフルオロ化合物の合成技術、高分子合成・分離技術、蛋白質精製技術などの成熟とあいまって1960年ごろより人工赤血球として人工酸素運搬体の開発が行われるようになった。日本でも人工赤血球の開発は早くから始められ、旧ミドリ十字社がパーフルオロ化合物の乳剤であるフルオゾールを開発し、一定の成績を収めてFDA (Food and Drug Administration, 米国食品医薬品局)より承認を受けたが、特殊な適応症のみの承認であったために広く使用されるには至らなかった。一方、ヘモグロビン(hemoglobin, Hb)を精製・修飾して酸素運搬体として利用するタイプの人工赤血球は北米で多くの企業が開発を行ってきた。Baxter社が開発したDCL-Hbは第3相試験まで研究が進んだが開発が中断された。一方、Biopure社の開発している重合ウシヘモグロビンを用いた人工赤血球は、現在北米を中心に第3相試験を行っており、南アフリカでは臨床応用がなされている。

以上のように開発が開始されて久しいが、投与後の血管抵抗の上昇や、組織機能、酸素運搬などの点で解決しなければならない問題点が多く、真の意味での臨床に用いられている物質はない。

■ 人工赤血球開発の現状

われわれは厚生労働省科学研究の一環として1985年より早稲田大学理工学部と共同で、人工酸素運搬体の開発と評価を行ってきた。現在二種類の人工酸素運搬体について研究を進めている。一つ目は期限切れの輸血用血液よりヘモグロビンを分離精製し、ウイルス除去、不活化を行ってからリン脂質小胞体(リポソーム)内に封入し、粒径を250nmに制御したヘモグロビン内包型リポソームであるヘモグロビン小胞体(Hb小胞体)と、二つ目がアルブミンに人工合成のヘムを包接させたアルブミンヘムとである(図)。これらの開発現状について紹介し、臨床検査法の開発についても言及する。

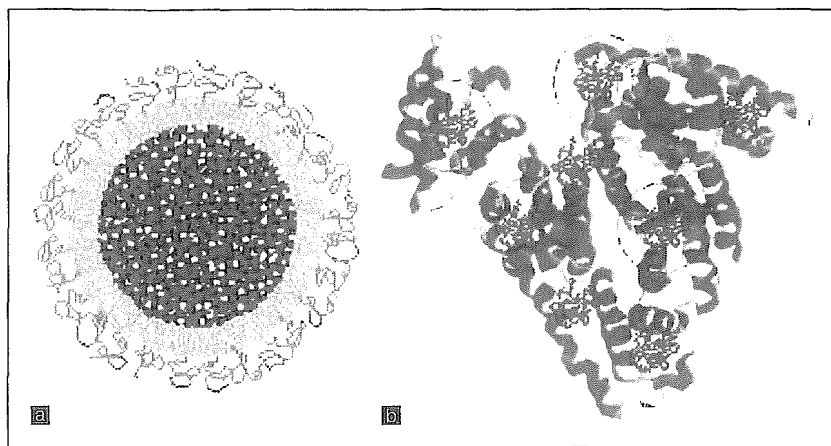


図 ヘモグロビン小胞体(a)とアルブミンヘム(b)の模式図

a: 精製したヘモグロビンをリン脂質二重膜に封入している。直径 250 nm。b: 人工合成のヘムをアルブミン分子に包接させた。

1. ヘモグロビン小胞体(Hb 小胞体)

Hb 小胞体は精製ヘモグロビンをヒトの赤血球のように脂質二重膜で被覆して粒径を制御し、酸素運搬能を持たせた物質である¹⁾。通常リポソームは自己粒子間の凝集や内皮細胞への付着、血小板の活性化などが問題となる。互いの凝集を防止し、血管内皮との相互作用を防止するためにポリエチレングリコール(polyethylene glycol, PEG)で膜表面を修飾し、血小板の活性化を抑制する負電荷脂質を用いてリポソームを形成している。また、長期保存を可能とするためには小胞体内のヘモグロビンが酸化されない環境を保持することが重要で、現在では窒素雰囲気下で Hb 小胞体を脱酸素化したデオキシ体として保存することによって 1 年以上の長期保存を可能としている²⁾。

生体内での酸素運搬能、循環保持能力については、交換輸注試験³⁾や出血性ショックの蘇生試験を中心に検討が行われている。ラット、およびウサギ、ビーグル犬において種々の検討が行われ、十分な酸素運搬能を有し、ショック蘇生に有効であることが解明されている。生体内での半減期は 35 時間(ラット)近くあることが報告された⁴⁾。

投与後の生体に与える変化であるが、成長阻害もなく、実験動物の体重の増加も順調であった。血中より消失した Hb 小胞体がどのように代謝されるかを病理組織を用いて検討したところ、3 時間後より脾臓の赤脾髄に集積し始め、7 日後をピークとして脾臓が腫大、重量も最大となり、その後正常域に復することが明らかとなってきた。腫大は赤脾髄のマクロファージが Hb 小胞体を貪食することによって起こり、脾臓内のマクロファージはいったん、貪食胞が飽和に達した

と思えるほど Hb 小胞体を貪食した後、経時的に正常像に回復し、7 日後には正常の組織構築を呈することを Sakai らが報告している⁵⁾。このような脾臓の変化はラットの保存血液を用いて行った同様の試験でも認められるので、Hb 小胞体に特有の現象ではないことも明らかとなった。

通常の薬品を開発する際には、LD₅₀ から、最大投与量を決定し、通常使用量を決定してゆく。しかし人工酸素運搬体に関しては、最大投与量をどのように決定すべきなのかについて明らかなコンセンサスは得られておらず、今後検討すべき課題であると考えられる。

長期生存に与える影響、免疫系に与える影響についても研究が進んでおり反復投与でも成長、血液生化学的検査などでの明らかな異常は認められていない⁶⁾。

リポソーム製剤を血管内に投与する場合、投与後に採血した血液内、特に血漿層にリポソームが分散し、血液・生化学検査が正しく評価できるかについて検討する必要がある。特に比色や比濁法で定量する臨床検査法では、Hb 小胞体の干渉作用のため検査結果に影響が出ることが予想された。この点に関しては採血後に血清を超遠心分離操作にかけて Hb 小胞体を沈殿除去することにより結果に影響を及ぼさないことが確認されている⁷⁾。

2. アルブミンヘム

アルブミンは血中で最も多い蛋白質であり、膠質浸透圧、粘度を維持し、体内のホメオスタシスを保持する重要な蛋白質である。アルブミンヘムはこの蛋白質に人工合成のヘムを包接という方法で導入し、酸素運搬を可能とした物質である。体内で酸素運搬能を有

し、出血性ショックの治療薬として有効である可能性が示唆されており^{8,9)}、現在研究が続行中である。血中にアルブミンヘムが投与された場合の臨床検査法についても、今後開発を進めてゆく必要がある。

まとめ

人工赤血球は通常の薬剤と異なり、血中で酸素を受け渡すことで機能を発揮し、血中にある程度の期間とどまることが要求されている。出血に対する治療薬としての用途のほか、虚血領域への酸素運搬を治療法とした Oxygen Therapeutics(酸素治療)についても研究が進んでいる¹⁰⁾。臨床応用が始まれば、臨床検査現場での対応も必要となるため、機器の開発、応用に関しても研究の展開が必要と考えられている。

輸血は20世紀の医療を大きく変えた治療法の1つであり、今日の日本での輸血は限りなく安全になっている。しかし、貯蔵、使用時の注意点を考えると人工血液があることによって輸血を補完できるシステムを構築できる可能性がある。この点で人工赤血球の開発は21世紀の医療の進歩に貢献できると考えられる¹¹⁾。

文 献

- 1) Sakai H, Hamada K, Takeoka S, et al: Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. *Biotechnol Prog* 12: 119-125, 1996
- 2) Sakai H, Tomiyama KI, Sou K, et al: Poly (ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug Chem* 11: 425-432, 2000
- 3) Kobayashi K, Izumi Y, Yoshizu A, et al: The oxygen carrying capability of hemoglobin vesicles evaluated in rat exchange transfusion models. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 25: 357-366, 1997
- 4) Sou K, Klipper R, Goins B, et al: Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 702-709, 2005
- 5) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, et al: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 159: 1079-1088, 2001
- 6) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, et al: Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 874-884, 2004
- 7) Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, et al: Pretreatment of serum containing hemoglobin vesicles (oxygen carriers) to prevent their interference in laboratory tests. *Clin Chem Lab Med* 41: 222-231, 2003
- 8) Tsuchida E, Komatsu T, Hamamatsu K, et al: 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. *Bioconjug Chem* 11: 46-50, 2000
- 9) Huang Y, Komatsu T, Yamamoto H, et al: Safety evaluation of an artificial O₂ carrier as a red blood cell substitute by blood biochemical tests and histopathology observations. *ASAIO J* 50: 525-529, 2004
- 10) Kobayashi K, Komatsu T, Iwamaru A, et al: Oxygenation of hypoxic region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res A* 64: 48-51, 2003
- 11) Kobayashi K, Tsuchida E, Horinouchi H (eds): *Artificial Oxygen Carrier, Its Front Line*. Springer, 2005

(^{*1} 慶應義塾大学医学部呼吸器外科
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35
^{*2} 同・教授
^{*3} 早稲田大学理工学総合研究センター)

新規腫瘍マーカーとしての 尿中ジアセチルスベルミン

やまぐちこうじ^{*1}、なかむらまさあみ^{*2}、わたなべまさひと^{*3}、とらだのぶひろ^{*3}
山口幸二^{*1}、中村雅史^{*2}、渡部雅人^{*3}、寅田信博^{*3}
あないもとあき^{*4}、かわきたまさお^{*5}、はまきなおたか^{*6}、たなかまさお^{*7}
穴井元昭^{*4}、川喜田正夫^{*5}、濱崎直孝^{*6}、田中雅夫^{*7}

はじめに

尿中ジアセチルスベルミンはポリアミンの尿中代謝産物の一つである。ポリアミンは活発に増殖する組織に多量に含まれており、細胞増殖に重要な役割を果たしていると考えられるが、アセチル化され、尿へ排泄されるが、その大部分はモノアセチル体である。ジアセチルスベルミンはポリアミンの1種であるスベルミンがジアセチル化されたもので、尿中ポリアミンの1%以下にすぎない。しかし、最近、癌患者に特異的に尿中排泄が増加することが知られるようになってきた。検体が尿であるため、採血の苦痛や針刺し事故の危険がなく、癌マーカーとしての機序より考えると臓器特異性がないことが推察され、癌検診に有用な“汎用性癌マーカー”として期待されている。

本稿では尿中ジアセチルスベルミンの研究の現況について概説した。

1. 尿中ポリアミン

複数のアミノ基を持つアルキルアミンをポリアミンと総称する。ヒトの体内には4種類のポリアミンと、

外科領域における輸血と血液製剤の現状と展望

7. 人工血液

慶應義塾大学外科

小林 紘一

キーワード

人工血液, 人工酸素運搬体(人工赤血球), ヘモグロビン小胞体(Hemoglobin-vesicles, HbV), アルブミンヘム, 人工血小板

I. 内容要旨

赤血球輸血は K. Landsteiner による血液型の発見によりその有効性と安全性が確立され, 臨床医学は大きく進歩した. しかし, 緊急輸血時の血液型判定の煩雑さ, 長期保存ができない, 輸血を介するウイルス感染や graft versus host disease (GVHD) の副作用の問題などがある. これらに対処するために血液型を考慮せずに使用でき, しかも棚置きできる人工酸素運搬体が開発されつつある. また, 血小板輸血はがん, 造血器腫瘍などに対する抗腫瘍療法の際の血小板減少や, 外科手術の際には病態によっては欠くことのできない治療法となる. しかし, 血小板需要の増加と血小板の短い保存期間のために起こる供給の不足や, 血小板輸血後のウイルス感染症の副作用などの問題がありこれに対処するために, 人工血小板の開発も始まっている.

II. はじめに

輸血は現代医学にとって欠かせない治療法の1つである. 血液は血球成分と血漿成分から構成されるが, 輸血に際しては全血輸血ではなく成分輸血が, また赤血球輸血では同種血輸血に変わり自己輸血が推奨されるようになった. これは血液成分の有効利用になるばかりでなく, 輸血に伴う副作用の予防という面でも重要である. 医工学の進歩は緊急事態に対応でき, 同種血輸血を回避できるような人工血液の開発を可能にしつつある. 本稿では血球成分の代替物である人工酸素

運搬体(人工赤血球)と人工血小板について述べる.

III. 人工酸素運搬体

現在のところ人工酸素運搬体には①フッ素の化合物で酸素溶解能の高い液体である perfluorocarbon (PFC), ②ヒトやウシのヘモグロビンを利用するもの, ③酸素運搬体としてヘム自体も合成し, このヘムの担体としてアルブミンを用いたもの(アルブミンヘム)などがある(図1)¹⁾²⁾. PFCは酸素運搬機能が低いことや使用時に酸素吸入を必要とすること, 粒子が網内系に蓄積するなどの問題が指摘されている.

ヒト由来の分子状のヘモグロビンをそのまま投与した時には図2に挙げたような問題が存在するのでこれを改善するための方法が必要である³⁾. その方法には2種類あり, 1つは cell free または acellular 型と呼ばれるもので, ヘモグロビンを分子内あるいは分子間架橋させて分子量を増加させ, 腎からの排出を防止し, 血中滞留時間を調整しようとするものであり, 修飾ヘモグロビンとも呼ばれている(図1の poly-Hb や PEG-Hb)²⁾. これらは, 膠質浸透圧が高くなるためにヘモグロビン濃度が 5~8g/dl に制限されるため酸素運搬能が十分でないといわれている. これらの製品は欧米で研究されており, 前臨床や, 臨床治験に入ったものがあり, その状況を表1に示す⁴⁾. しかしこれらは分子が小さいので血管内皮に接近するため血管内皮により産生される nitric oxide (NO) を吸着し, 血圧上昇をきたすのでこの欠点をどのように修正するかが問題となって

ARTIFICIAL BLOOD

Koichi Kobayashi

Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

7. 人工血液

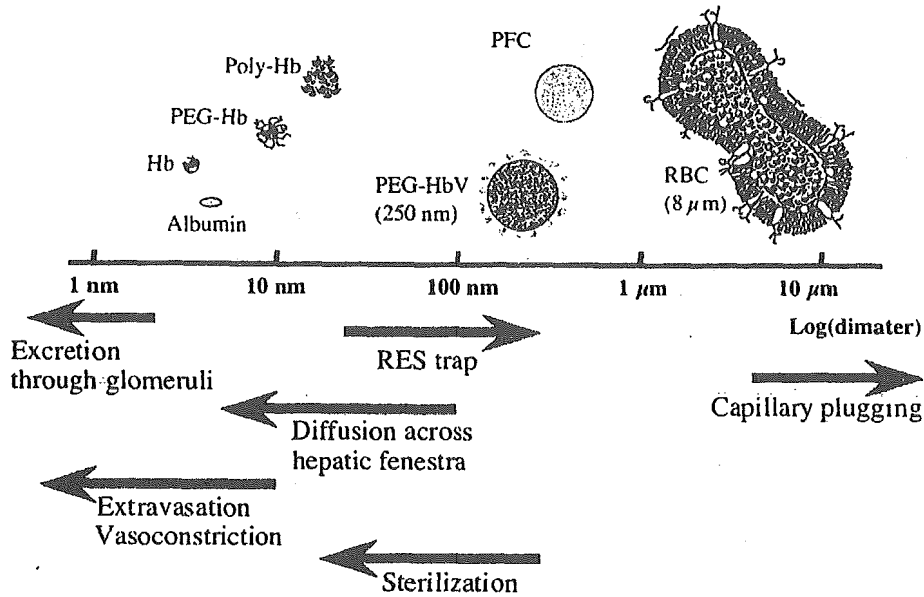


図1 What is the optimal dimension of O₂ carriers?

表1 Hemoglobin based oxygen carriers in development as red blood cell substitutes

Product	Hb source	Technology	Developer	Status
DCL-Hb (HemAssist)	Human red cells	α-α crosslinked Hb	Baxter Healthcare (Deerfield, IL, U.S.A.)	Phase III (trauma) (suspended)
RHb1.1/1.2 (Optro)	<i>E. coli</i>	Recombinant human α fused Hb	Baxter Healthcare (Somatogen < 1998)	Phase II (discontinued)
RHb2.0	<i>E. coli</i>	Recombinant Hb	Baxter Healthcare	Preclinical
HBOC-201 (Hemopure)	Bovine red blood cells	Glutaraldehyde polymerization	Biopure (Cambridge, MA, U.S.A.)	BLA filed (elective surgery). Approved for clinical use in S. Africa
Human POE-Hb (PHP)	Human red cells	PEG conjugation	Curacyte (Apex) (Munich, Germany)	Phase III (septic shock)
Hb-raffimer (Hemolink)	Human red cells	Oligomerization with o-raffinose	Hemosol (Toronto, Canada)	Phase III (cardiac surgery) (suspended)
Pyridoxal polyHb (PolyHeme)	Human red cells	PLP-Hb polymerized Hb with glutaraldehyde	Northfield Laboratories (Evanston, IL, U.S.A.)	Phase III (trauma) Filed BLA
Hemospan	Human red cells	Conjugated with maleimide PEG	Sangart (San Diego, CA, U.S.A.)	Phase II (elective surgery)
HemoZyme	Human red cells	Polynitroxylated Hb	SynZyme (Irvine, CA, U.S.A.)	Preclinical
PolyHb-SOD-CAT	Bovine red cells	Hb modified with SOD and catalase	McGill University (Montreal, Canada)	Preclinical
PEG-Hb	Bovine red cells	PEG conjugated Hb	Enzon (Piscataway, NJ, U.S.A.)	Phase Ia (discontinued)
OxyVita	Human/bovine red cells	Stabilized Hb with sebacoyl diaspirin	IPBL Pharm. (Goshen, NJ)	Preclinical
HemoTech	Bovine red cells	Modified Hb with o-ATP, o-adenosine, and glutathione	HemoBioTech (Amarillo, TX, U.S.A.)	Preclinical

いる¹⁾²⁾。

一方、土田らにより開発されたヘモグロビンをリポソームの人工膜でカプセル化した細胞型 (cellular 型) の酸素運搬体は、膠質浸透圧や粘度の調整が容易であ

る。本物質はヘモグロビン小胞体 (hemoglobin vesicle-HbV) と呼ばれておりこの HbV はリポソームの内側に 35% 以上の濃度でヘモグロビン粒子が詰め込まれており、十分な酸素運搬能力を持っている^{2),3)-5)}。リポソ-

7. 人工血液

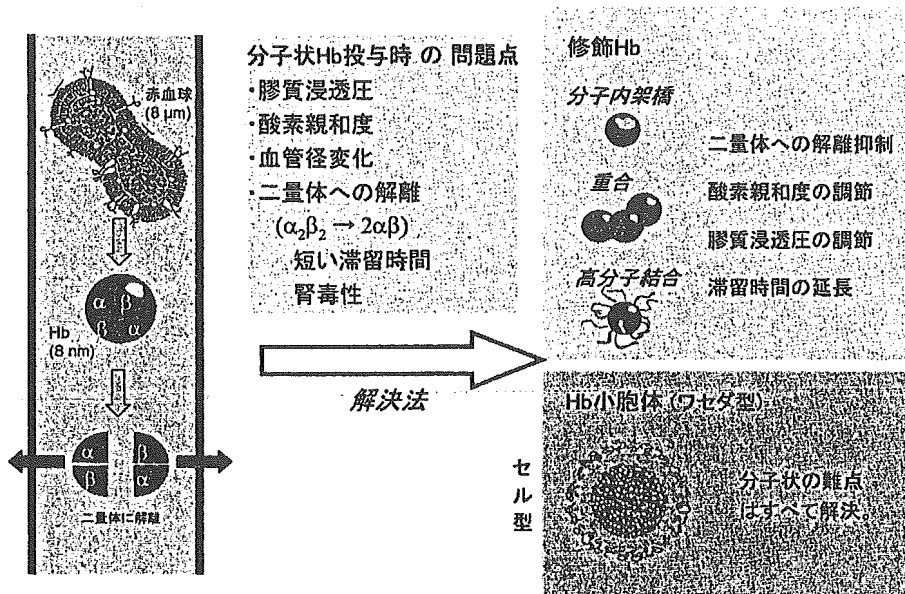
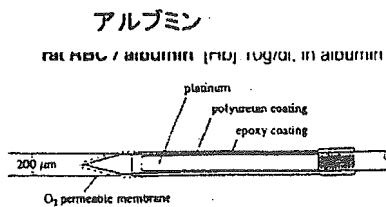


図2 分子状Hbの問題点と解決法

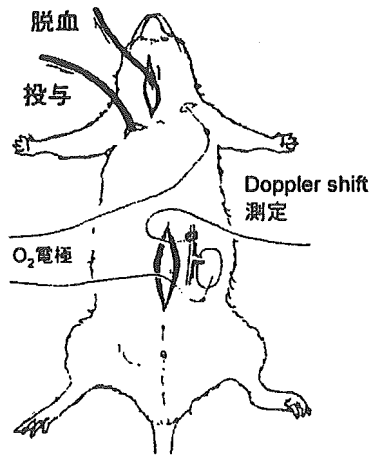
Wistar系ラット(♂, 344 ± 15g)

1. 頸動静脈に挿管。
2. 腎皮質に酸素電極を刺入。
3. ドップラープローブを腹部大動脈に取付。
4. 90%交換輸血試験:

試料:Hb小胞体/アルブミン



Polarographic酸素電極



ASAIO J. 43, 289-297 (1997)
Bioconjugate Chem. 8, 23-30 (1997)

図3 Hb小胞体による90%交換輸血試験

ムの表面は親水性高分子(ポリエチレングリコール)により被覆されておりこの親水性高分子により、HbV同士の融合や血液との接触による凝集を防止することができる²⁾⁵⁾。この製品の直径は約250nmである(図1, 図2)。この製品は室温溶液状態で2年間、また乾燥状

態ではさらに長期の保存が可能である。粉末は適量の溶液に溶かすだけで使用できるという特徴がある²⁾。HbVを用いたラットにおける90%交換輸血実験(図3)のデータを示す(図4)⁶⁾。5%アルブミンにHbVを溶解した液で交換輸血を行った群ではそれぞれのコ

7. 人工血液

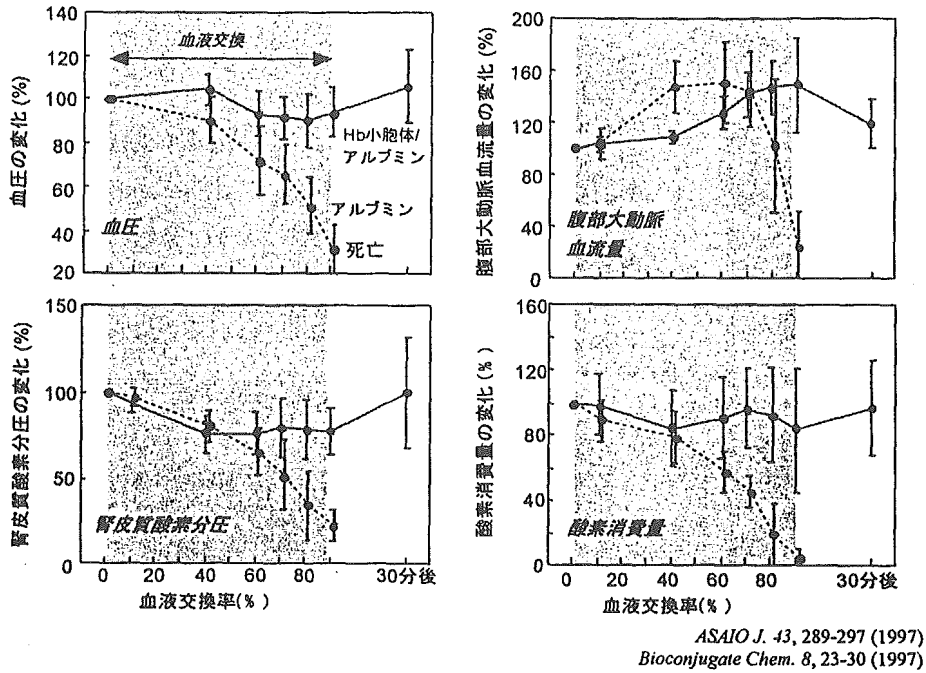
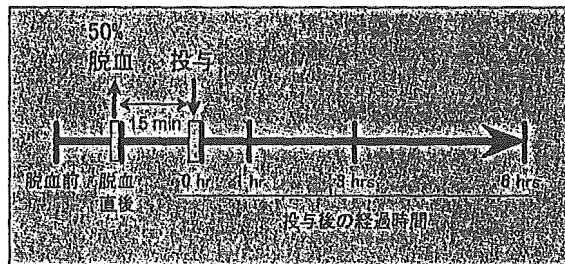


図4 Hb小胞体による90%交換輸血試験

1. 雄性Wistar rat (280 ± 27 g)
2. 吸入麻酔(1.5% sevoflurene)
3. 右頸静脈に挿管
4. 測定項目:
血圧, 心拍数, ヘマトクリット,
PaO₂, PaCO₂, pH, 乳酸値
組織病理



蘇生液	
HbV/rHSA	HbV suspended in rHSA, [Hb] = 8.6 g/dL
wRBC/rHSA	Washed RBC suspended in rHSA, [Hb] = 8.6 g/dL
rHSA	recombinant human serum albumin, 5 g/dL

Crit. Care Med. 32, 539-545 (2004)

図5 Hb小胞体の投与による出血ショックからの蘇生

ントロール値を維持したが、5% アルブミンのみで交換輸血を行った群では全例死亡した。

HbV のショックからの蘇生実験(図5)では、5% の recombinant アルブミンに HbV を溶解した液を投与し

た HbV/rHSA 群では、recombinant アルブミンに自己洗浄赤血球を浮遊させた液を投与した群と同様に8例全例が6時間も生存していた(図6)⁷⁾。このように HbV が酸素運搬体として機能していることが証明され