

図3 ヘモグロビン小胞体と修飾ヘモグロビン(被覆膜のない分子状)の比較

無麻酔下、酸素輸液を $7 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ハムスター) に投与、血圧と抵抗血管径 (A_0 , $158 \pm 21 \mu\text{m}\phi$) の動態を非侵襲的に観測。修飾 Hb (XLHb: $7 \text{ nm}\phi$, PEG-PLP-Hb: $22 \text{ nm}\phi$, poly-XLHb: $47 \text{ nm}\phi$, HES-XLHb: $68 \text{ nm}\phi$) では、いずれも血圧亢進 (A) と抵抗血管の収縮 (B) を認め、Hb 小胞体 (HbV: $250 \text{ nm}\phi$) で血圧亢進、抵抗血管収縮を認めない。直径 $150 \text{ nm}\phi$ 以上の粒子系の投与では、きわめて安定。(文献 20: 図 1)

3. Hb 小胞体の安全度と効果の確認

1) 安定構造の追求

実は Hb 小胞体を酸素輸液に利用する考えは、人工赤血球発想の当初から存在した^{10,11)}。被覆材料の選定と設計、精製 Hb (純度 $\geq 99.9\%$ 以上/濃度 $\geq 35\%$)、高純度特定組成の被覆膜 (nano size 分子層膜)、小胞体粒径 ($200\text{--}250 \text{ nm}\phi$) の範囲で均一分布)、均一粒度分布の生理塩水溶液、溶液物性はヒト血液に同じ、混合安定度あり、加えて効率よい製造工程と安価に供給できる技術の完成によりようやく見通しがついてきている¹²⁻¹⁴⁾。Hb 小胞体粒子の表面修飾により、小粒ではあるが赤血球と同様に循環系で凝集、融合なしに安定に機能発揮ができ、規格に合った調剤の形で体内浸透圧と同じに調整、この型物質を全く含まない粒子系が結果として Hb の役割を代行でき、Hb 小胞体の酸素親和度¹⁵⁾、粒子の半寿命や代謝過程なども調節できる。

この粒子あたり Hb 3.0×10^4 個を内包、したがって 1.2×10^5 個の酸素を供給できる。この生理塩水分散溶液は膠質浸透圧がないので Hb 濃度を任意に調整でき、通常は $10 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$ に調整するが、これで赤血球 (Hb: 3.0×10^8 個) とほぼ同

量の酸素供給ができる。被覆膜は、リン脂質および電荷脂質 (1,5-bis-*O*-hexadecyl-L-glutamate-*N*-succinic acid) を含み、 9.1×10^4 個のリン脂質分子が構成する。最終的には分子二層膜被覆を利用、強度はこれで充分との結論が得られている。表面には粒子単位表面積あたり 5.1×10^{-3} 個 $\cdot \text{nm}^{-2}$ の水溶性高分子鎖 [P(OE)_n: Mw 5 kDa] を導入、これが粒子安定化 (凝集、融合の防止) に役立っている (図 2)。P(OE)_n 脂質の含量は、全脂質成分に対してわずか $0.3 \text{ mol}\%$ であるが、高分子添加凝集試験そのほかから凝集防止に有効な含量として設定、表面のみに配置する方法も確立している¹⁶⁾。室温で 2 年間保存後にも粒子径の変化や凝集体の生成は認めず、静脈内投与により血液成分と接触しても安定な分散粒子系として循環する^{17,18)}。

2) 微小循環動態への影響

最初の修飾 Hb 製剤 (米, 分子内架橋型 HemAssistTM, 1998 年) の臨床試験では、前述した裸の Hb 分子に由来する副作用により中断の報道があった。内皮細胞から平滑筋への血管弛緩の情報伝達分子 (NO) を、静脈内投与の Hb 分子が血管内皮細胞と平滑筋の間隙まで浸透して生起する NO 捕捉の結果として、平滑筋の収縮

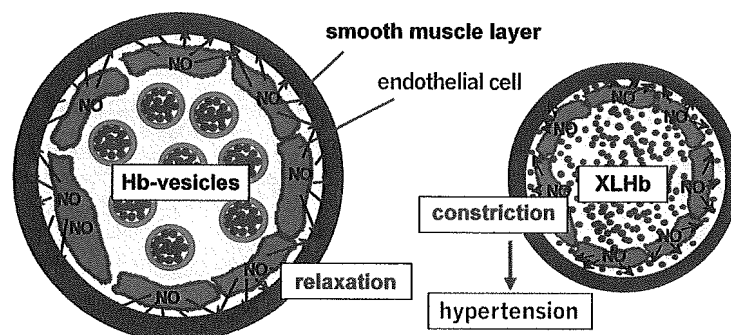


図4 修飾ヘモグロビン投与時に生起する血管収縮
修飾 Hb は内皮細胞由来の弛緩因子 (NO) を捕捉配位するので、濃度低下が血圧上昇の原因となる。毛管直径は最大 2/3 に至る。

(血管収縮) による血圧亢進招来が理由^{8,19)}とされている。筆者らは、M. Intaglietta (UCSD) とも共同して、ハムスター皮下の微小循環を window chamber 経由の顕微鏡システム利用で、投与直後からの血流動態や、毛細血管径の動的变化を経時的に詳細解析して、Hb 小胞体では [P(OE)_n 鎖] 修飾による安定度向上により、安定な循環挙動が計測でき、血流状態に全く影響¹⁸⁾を与えないこと、各種条件の酸素輸液投与時の抵抗血管径と血圧の変動観測を実施した (図3)。修飾 Hb (特に分子内架橋 Hb の場合) が最も抵抗血管径収縮が顕著 (管径で 1/3 の収縮) であり、同時に相当する血圧亢進が観測される。この収縮は末梢循環阻害と組織の酸素供給量を低下させる。収縮は粒径の大きさ、あるいは投与量に比例して小さくなり、直径 250 nmφ の Hb 小胞体では血管収縮も血圧亢進も認められなくなる²⁰⁾。この Hb 小胞体は、開発推進している酸素輸液では最大の粒子径対象の製剤であり、修飾 Hb のように血管内皮細胞の間に浸透しないため、NO 捕捉による副作用は一切認めない (図4)。

一般に生体内のガス分子 (NO あるいは CO) の役割は、情報伝達因子として見出され、正常肝臓で CO が血管拡張因子として作動することが観測されている²¹⁾。肝臓では、肝実質細胞に存在する hemeoxygenase (HO-2) がヘムを分解する際に CO を放出するが、Hb は類洞内皮細胞間の細孔 (fenestration 直径: 100-150 nmφ) を透過して Disse 腔に到達し、CO 捕捉 (親和度は酸素

の約 200 倍²²⁾) により血管収縮を生起させる。

例えば、摘出肝臓での灌流実験では、Hb で血管抵抗の上昇と類洞の狭小化が観測されるが、metHb (CO の結合なし) の場合ではこれら変化は観測されない、また fenestration 細孔径より大きい size の Hb 小胞体では血管収縮を全く生起しないことが確認されている (図5)²³⁾。

3) 血液成分との相互作用

小胞体制剤の免疫系への影響は、補体活性化や血小板活性化の作用など報告^{24,25)}があるが、Hb 小胞体の場合ではこれら副作用を認めない。構造明確な高純度脂質分子を膜成分に使用し、免疫系への作用を判断しながら選定しているため高い血液適合性があり、ヒト血液との混合試験では血液凝固、血小板凝集、セロトニン放出、カリクレイン-キニン系への影響など、従来報告にある小胞体の問題点と指摘されてきた諸因子に著しい改善が見られ、投与試験 (ラット) でも補体活性化、血小板凝集などを認めない^{26,27)}。

免疫系の制御因子 [インターロイキン (IL), インターフェロン (IFN), 腫瘍壊死因子 (TNF)] などの情報伝達分子群 (サイトカイン) の計測にも意を払っている。酸素輸液の投与を想定する出血時投与では、創傷治癒や造血因子にかかわる多くのサイトカイン類の放出が想定されるが、酸素輸液投与時の評価は、これらサイトカイン類の生理的産生カスケードの妨害による生理機能低下や、異常産生による副作用の両面からの検討が重要となる。血液製剤については、保存中に

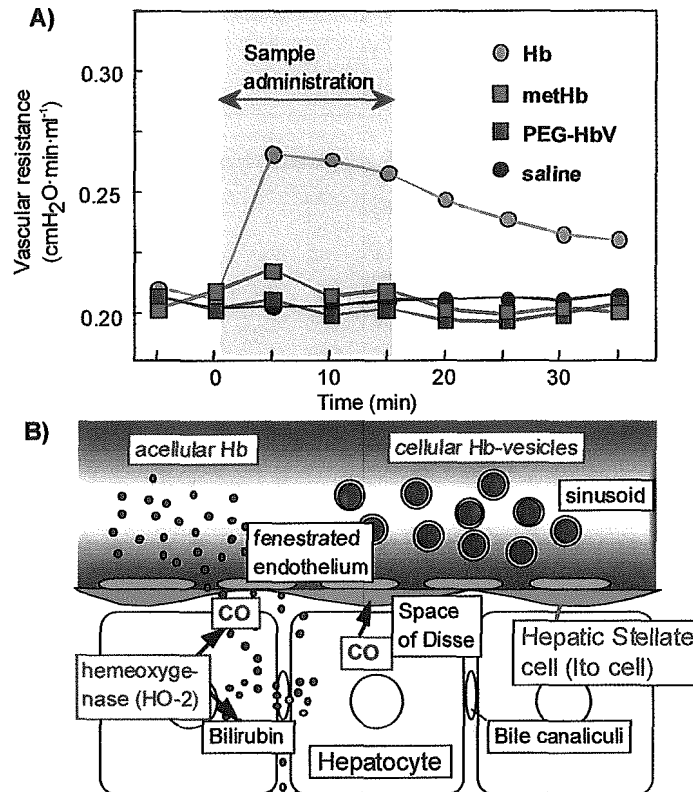


図 5 ヘモグロビンの代謝と肝微小循環動態

A：精製 Hb 溶液を用いた摘出肝灌流での灌流圧上昇。Hb 小胞体と metHb 投与の場合には灌流圧上昇がない。(文献 23：図 2 を改変引用)

B：灌流圧変動の仕組み。CO は類洞血管を覆う Ito 細胞に血管弛緩因子となっているのを解明。

白血球や血小板から放出されるサイトカインによる副作用が懸念²⁸⁾されるが、Hb 小胞体では製剤自体からの産生がない点は確かに利点である。A.S. Rudolph²⁹⁾ は、Hb 内包小胞体投与に際して血中の IL-6 や TNF- α 測定値の上昇を報告。この場合、培養細胞では肝臓や脾臓のマクロファージや内皮細胞からの放出が明らかにされている³⁰⁾。Hb 小胞体とヒト血液との混合試験では、現在のところ血小板由来の炎症性サイトカイン (RANTES) 放出は認めないが、無菌、かつ発熱物質混在のないことが保証された Hb 小胞体系についてのサイトカイン産生カスケードに関する *in vivo* 試験を開始しているので、いずれ詳細が明らかになる。

4) Hb 小胞体投与後の体内分布と代謝

Hb 小胞体の体内動態の検討は W.T. Phillips (San Antonio, U. Texas) との共同で推進、Hb 小胞体に導入されている少量のホモシステインのチオール基に結合した technetium-99 m (^{99m}Tc, 半減期 6 時間) を追跡子とし、これをラットに静注 (血液量の 25% に相当)、血中残存率と体内動態の経時変化を γ -camera で追跡、血中半減期は 35 時間で肝、脾、骨髄の細網内皮系に捕捉、投与後 24 時間で捕捉量は一定値となる³¹⁾ (図 6)。投与後 48 時間には Hb 小胞体投与全量の 10.9 \pm 0.8% が肝、6.6 \pm 0.3% が脾に集中、摘出した肝と脾の病理組織学的解析から、Hb 小胞体は肝のクーパー細胞および脾のマクロファージに捕捉されるのが明らかになっている³²⁾。

血液生化学検査では、Hb 小胞体を捕捉した後

でも肝組織機能を反映する酵素 (GOT, GPT) 濃度に著変を認めず, 正常に維持されていると判断される。免疫抗体染色法を利用してラット肝臓および脾臓中で, Hb 小胞体由来のヒト Hb およびリン脂質成分の代謝を追跡した結果, いずれの臓器からも投与後 7 日以内にほぼ消失する (図 7)³²⁾。Hb 小胞体の代謝は, クッパー細胞やマクロファージでの老化あるいは損傷した赤血球代謝と同経路であり, Hb 製剤として適した経路といえる³³⁾。

以上述べたように酸素輸液の安全度確保には, 生体組織の濾過現象の理解, micro と macro な視点から投与試料の体内動態把握, 代謝まで含めた製剤設計が必要となる。微粒子製剤では, 粒子径が $3\ \mu\text{m}\phi$ 以上の場合には主に肺の毛細血管栓塞が発生³⁴⁾, 粒子径が $1\text{--}3\ \mu\text{m}\phi$ では赤脾髄組織の網目構造での捕捉³⁵⁾, $150\ \text{nm}\phi$ 以下になると先述の類洞細孔 (fenestration) 透過が問題となる³⁶⁾。さらに, 除菌フィルタ処理 (孔径 $0.22\ \mu\text{m}\phi$) 可能, 内包効率などの静注製剤化の要件を含め, 安全投与できる Hb 小胞体の最適粒径 ($150\text{--}300\ \text{nm}\phi$) と均一粒度分布が重要な意味を持つことになる (図 8)。

4. 血液と比較した酸素輸送の効果

Hb 小胞体の有効性は, 酸素輸送量, 酸素消費量, 混合静脈血酸素分圧, 臓器の組織酸素分圧や pH, 乳酸/ピルビン酸比などを指標とし³⁷⁾, 末梢組織まで血液と同量の酸素輸送が確認されている。Hb 小胞体はアロステリック因子としてピリドキサーール 5'リン酸を共存させ, 酸素親和度 (P_{50}) を赤血球同等の $27\text{--}32\ \text{torr}$ に設定, Hb 濃度 ($10\ \text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$) は血液中の濃度 ($15\ \text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$) より若干低めに設定。Hb 小胞体自体での酸素輸送を実証するモデル (ラット) では, 血液量の 90% 近くまで Hb 小胞体で交換輸血して, 血液循環動態, 血圧, および組織酸素分圧を計測したところ, 赤血球と同等の酸素輸送量と生存を保証できることが明示された (図 9)³⁸⁾。ラット血液の 50% を脱血し出血性ショック状態とした後, 脱血液と等容量の Hb 小胞体を静注投与して, 酸素輸送因子を計測したところ, 脱血前の数値に回復が

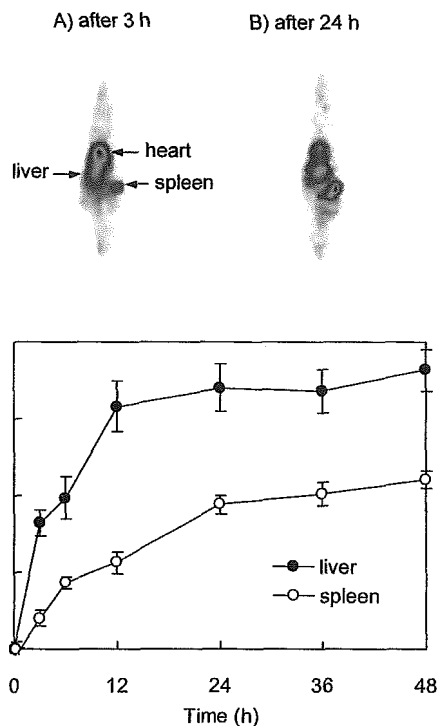


図 6 標識ヘモグロビン小胞体投与後の γ -camera 像と臓器捕捉量の経時変化

標識 Hb 小胞体を負荷投与 (ラット血液の 25% 相当量), 経時的 γ -camera 像から肝と脾への捕捉量を観測。Hb 小胞体は肝や脾の細網内皮系に捕捉され, 投与 3 時間後では心臓の血液プール (A), 24 時間後では肝と脾に多く検出される (B)。捕捉量は投与後 24 時間で一定値となる。

確認された^{39,40)}。

5. Albumin-heme (アルブミン-ヘム) の安全度と効果の確認

1) 安定構造と物性

最近では組換えアルブミン (rHSA: Mw. 66 kDa) の生産供給が進行している。著者らは, rHSA と精密合成のヘム誘導体が自発的に分子集合することを見出し, これを albumin-heme (アルブミン-ヘム) と命名⁴¹⁾。rHSA は 1 分子で最大 8 個もヘム誘導体を包接でき, 酸素分圧に応じて酸素を吸脱着できるので酸素輸液として機能できる。動力学計算結果では, rHSA 疎水場にヘム誘導体を包接した構造が熱力学的に最安定と

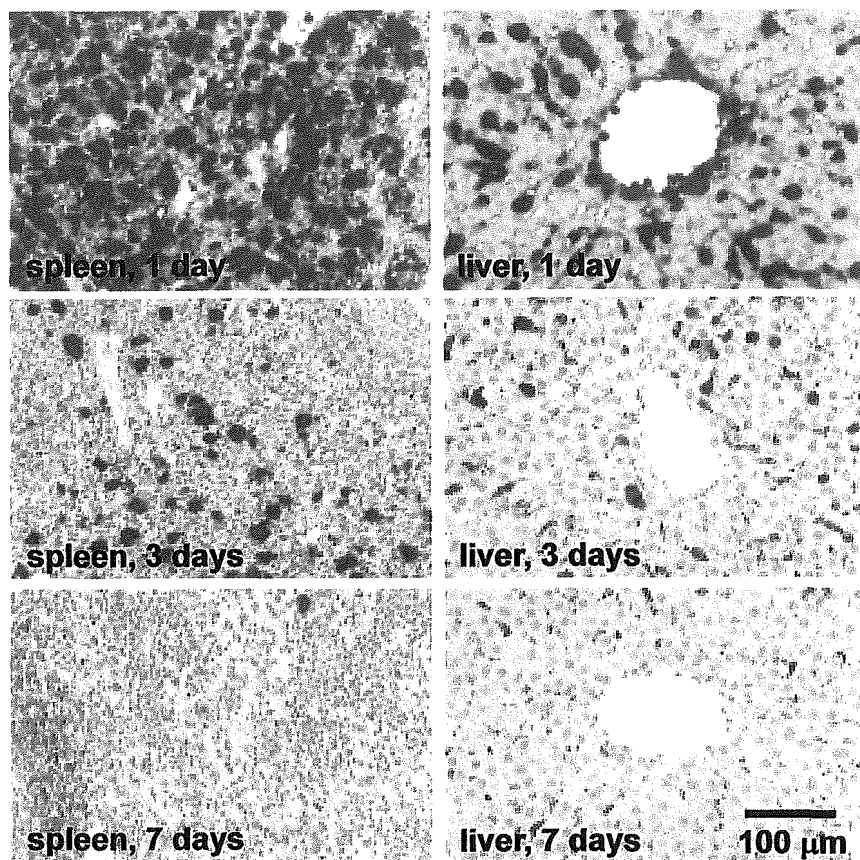


図 7 ヘモグロビン小胞体の代謝過程

Hb 小胞体投与後のラット肝, 脾組織の顕微鏡写真。

抗ヒト Hb 抗体染色による赤染はヒト Hb の存在部位を示す。投与 1 日後では多量ヒト Hb の存在を認めるが, 7 日後には消失し, 蓄積は認めない (文献 32: 図 3)。

なり (図 10), X 線結晶構造解析から, より詳細構造の追及を開始している。物理化学的測定では, ヘム誘導体を包接した後も rHSA の高次構造, 表面電荷, 溶液物性などの数値から, 包接前と変わらないことが証明され⁴²⁾, 酸素親和度は heme 化学構造を変化させ任意に調整でき, 当然ヒト赤血球と同等にも調節できる⁴³⁾。この赤褐色透明の溶液は, 室温で 1 年間保存しても変化せず, 安定溶液として長期保存できる⁴⁴⁾。

2) 安全度と酸素輸送効果

Albumin-heme は Hb で問題となる NO 捕捉による血管収縮 (血圧亢進) を示さない (図 11)⁴⁵⁾。これは rHSA 表面の等電点 (pI: 4.8) によるものであり, 内皮外側にある基底膜との静

電反発が内皮からの漏出を防止するため, 血管壁透過度は Hb と比較して 1/100 程度と低いことに起因している。出血ショックモデル (ラット) へ albumin-heme 溶液を投与すると, 血圧, 血流量は回復し, 主要臓器や末梢組織の酸素分圧も上昇, 生体内でも albumin-heme が酸素を輸送していることが実証されている⁴⁶⁾。また最近では, 小粒径 (8 nm ϕ) の特徴を利用して, 腫瘍組織内に存在する低酸素領域の酸素化に有効が明らかにされている⁴⁷⁾。体内分布や代謝過程など安全度に関する知見が集積してきているので, 間もなく最適分子構造と適応条件が確定できる見通しである。

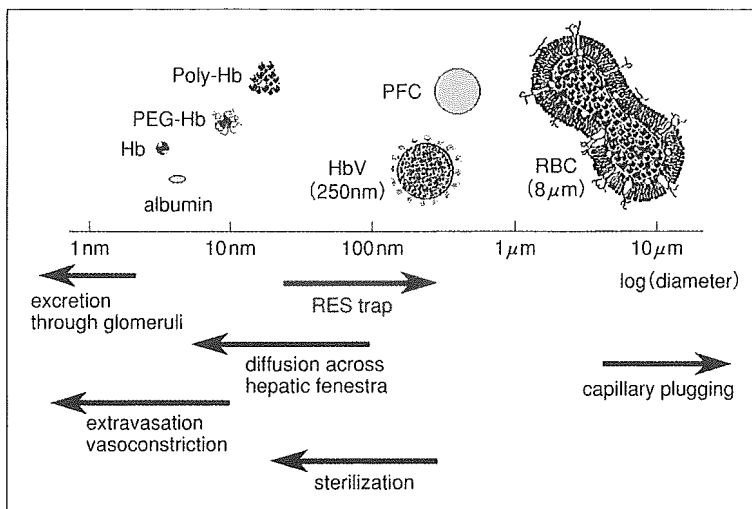


図 8 酸素輸液の開発
 酸素輸液としての最適粒径 (150-300 nmφ) の予測。

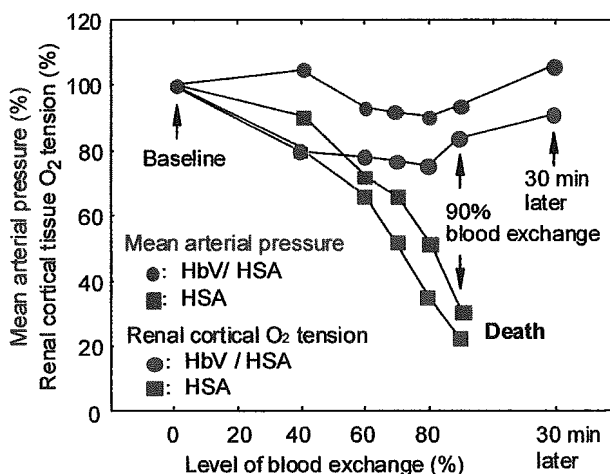


図 9 ヘモグロビン小胞体による交換輸血試験
 γHSA 5%溶液で全血液量の 90%を置換すると、血圧、組織内酸素量 (腎皮質酸素分圧) も低下、ただちに死亡。これに対し、Hb 小胞体/HSA で置換した場合は、初期値をほぼ維持して生存できる (文献 38: 図 5, 7)。

まとめ

酸素輸液の用途は非常に多岐にわたると同時に、災害などの緊急時に際して効率よく多量の生産と常備達成に対応できるとする幅広い期待がある。現在、医療分野から提案のある適応では、出血ショック蘇生液としての適応はもちろん、術中出血の補充、術前血液希釈、急性貧血、あるいは

は稀少血液型患者への輸血など輸血代替としての利用に加え、虚血部位への酸素供給^{48,49)}、腫瘍組織酸素化による抗腫瘍増強⁴⁷⁾など、治療効果を期待する新しい適応にも成果が出てきている (表 1)。

日赤血液センターからの期限切れ赤血球利用の依頼を受けて、酸素輸液の展開に尽力してきたが、遺伝子組換え技術の進歩により近い将来には

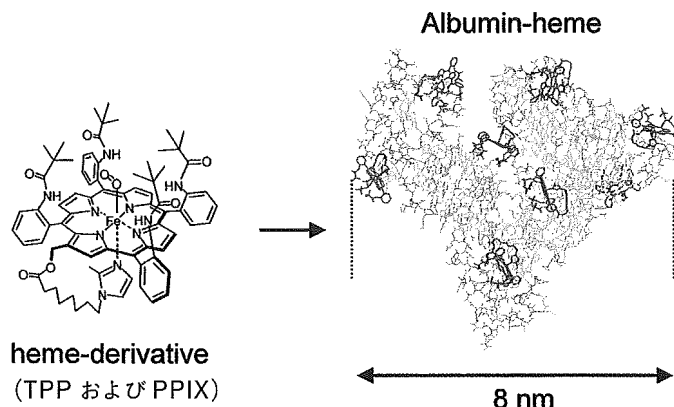


図 10 アルブミン-ヘムの構造
 アルブミンにヘム誘導体を包接させた分子。ヘム誘導体は最大 8 個まで包接され、酸素輸液として機能する。

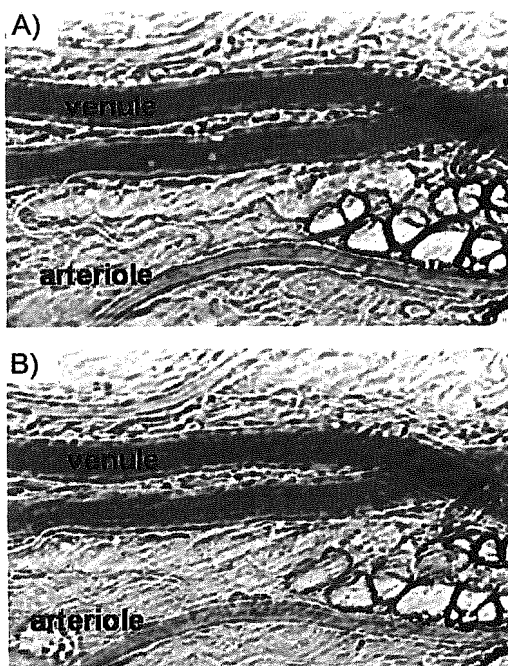


図 11 アルブミン-ヘム投与後の微小循環動態
 ラット腸間膜のビデオ画像。(A) アルブミン-ヘム投与前、(B) アルブミン-ヘム投与後 90 秒の比較では、腸間膜細動脈径と細静脈径ともに全く変化なし。(文献 45: 図 2, video 記録)

Hb は工場生産できることになろう。現在の課題は、脂質二分子層膜で高濃度 Hb を封入するナノ制御技術のシステム化およびその設備設置を早急に完了させ、非臨床試験により有効性、安全性の

表 1 酸素輸液適応への期待

適応例
輸血代替 出血ショック蘇生 術中出血の補充 術前血液希釈 急性貧血 稀少血液型患者への輸血
酸素療法 虚血部への酸素供給 (心不全/脳障害/呼吸不全) 腫瘍組織酸素化による抗腫瘍増強効果 体外循環回路 (人工心肺) 充填液 組織再生用培養細胞への酸素供給 (肝, 脾, 心筋, 骨髄, 骨, 皮膚, 血管など) 移植用臓器灌流保存液 (肝, 腎, 脾, 腸, 心, 肺など)

確認を順次進めることであり、併せて治験プロトコルの作成も進行する必要がある⁵⁰⁾。

1970 年代から着手された酸素輸液開発の研究において、観測法進歩により当初予測しなかった新知見の集積、必要な淘汰を経て最適系に絞られてきた。細胞型酸素輸液の開発には高度の分子集合技術が必要とするため、比較的容易に製造できる修飾 Hb が先行した経緯がある。しかし、Hb 利用には赤血球のように被覆膜 (細胞構造) が不可欠である。アルブミン-ヘムの場合は、アルブミンが等電点 (pI: 4.8) であり電荷の相違が内

皮細胞との反発を招来するため、接近できないのが原因であろう⁴⁵⁾。新しい適応分野も拓けてきているので、各製剤の特徴を活かして、今後ますますの発展が期待されている。

謝辞：本稿に紹介の研究成果は、厚労科学研究費補助金 (H 9-14/代表者 土田英俊) (H 15-17/代表者 小林紘一) により推進された内容を主としている。ここに記して謝意を表する。

引用文献

- 1) 土田英俊, 酒井宏水, 武岡真司, 宗慶太郎, 小林紘一. 酸素輸液 (人工赤血球). 医学のあゆみ 2003 ; 205 : 558-66.
- 2) 池田久實. 次世代の血液製剤を考える. エフ・コピント. 富士書院 (札幌) ; 2003. p.3-13.
- 3) Tsuchida, E, editor. Blood substitutes. Present and future perspective. Amsterdam : Elsevier ; 1998.
- 4) Mitsuno T, Ohyanagi H, Naito R. Clinical studies of a perfluorochemical whole blood substitute (Flosol-DA) Summary of 186 cases. Ann Surg 1982 ; 195 : 60-9.
- 5) Manning LR, Morgan S, Beavis RC, Chait BT, Manning JM, Hess JR, et al. Preparation, properties, and plasma retention of human hemoglobin derivatives-comparison of uncrosslinked carboxymethylated hemoglobin with cross-linked tetrameric hemoglobin. Proc Natl Acad Sci USA 1991 ; 88 : 3329-33.
- 6) Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. Free Radic Biol Med 1997 ; 22 : 1075-99.
- 7) Yeh LH, Alayash AI. Redox side reactions of haemoglobin and cell signalling mechanisms. J Intern Med 2003 ; 253 : 518-26.
- 8) Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Takeoka S, Tsuchida E. Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. Bioconjug Chem 2000 ; 11 : 56-64.
- 9) Takeoka S, Teramura Y, Atoji T, Tsuchida E. Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation. Bioconjug Chem 2002 ; 13 : 1302-8.
- 10) Tsuchida E, editor. Artificial Red Cells. New York ; John Wiley ; 1995. (Kambara S, Kimoto S, 1965-1971)
- 11) Djordjevich L, Miller IF. Synthetic erythrocytes from lipid encapsulated hemoglobin. Exp Hematol 1980 ; 8 : 584-92.
- 12) Takeoka S, Ohgushi T, Terase K, Ohmori T, Tsuchida E. Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. Langmuir 1996 ; 12 : 1755-9.
- 13) Sakai H, Masada Y, Takeoka S, Tsuchida E. Characteristics of bovine hemoglobin as a potential source of hemoglobin-vesicles for an artificial oxygen carrier. J Biochem 2002 ; 131 : 611-7.
- 14) Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using the freeze-thawing and extrusion. Biotechnol Prog 2003 ; 19 : 1547-52.
- 15) Sakai H, Tsai AG, Rohlfes RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitutes: influence of O₂ affinity. Am J Physiol 1999 ; 276 : H 553-62.
- 16) Sou K, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles. Bioconjug Chem 2000 ; 11 : 372-9.
- 17) Sakai H, Tomiyama K, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E, Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. Bioconjug Chem 2000 ; 11 : 425-32.
- 18) Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, et al. Subcutaneous microvas-

- cular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* 1997; 40: 66-78.
- 19) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric-oxide release accounts for the biological-activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
- 20) Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H 908-15.
- 21) Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem. Biophys Res Commun* 1994; 205: 1333-37.
- 22) Wyman J, Bishop G, Richey B, Spokane R, Gill S. Examination of Haldane's first law for the partition of CO and O₂ to hemoglobin A0. *Biopolymers* 1982; 21: 1735-47.
- 23) Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, et al. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998; 101: 604-12.
- 24) Szebeni J. The interaction of liposomes with the complement system. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998; 15: 57-88.
- 25) Reinisch LW, Bally MB, Loughrey HC, Cullis PR. Interactions of liposome and platelets. *Thromb Haemost* 1988; 60: 518-23.
- 26) Wakamoto S, Fujihara M, Abe H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release in vitro. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001; 29: 191-201.
- 27) Abe H, Yamaguichi M, Fujihara M, Wakamoto S, Hirayama J, Takeoka S, et al. Effect of hemoglobin vesicles on blood cells and complement in rat. Abstract in 9-International Symposium on blood substitute. *人工血液* 2003; 11: 114.
- 28) 藤原満博, 岩本志乃舞, 池淵研二, 東 寛, 池田久實. 保存による血液製剤中のサイトカインレベルの変化. *日本輸血学会誌* 2002; 47: 829-36.
- 29) Rollwagen FM, Gafney WC, Pacheco ND, Davis TA, Hickey TM, Nielsen TB, et al. Multiple responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin (LEH): Effects on hematopoiesis and serum IL-6 levels. *Exp Hematol* 1996; 24: 429-36.
- 30) Zhu XL, Pacheco ND, Dick EJ, Rollwagen FM. Differentially increased IL-6 mRNA expression in liver and spleen following injection of liposome-encapsulated haemoglobin. *Cytokine* 1999; 11: 696-703.
- 31) Sou K, Klipper R, Goins B., Phillips WT, Takeoka S., Tsuchida E. Pharmacokinetics of the hemoglobin-vesicles (HbV) in rats. Abstract in 9-International Symposium on blood substitute. *人工血液* 2003; 11: 117.
- 32) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, et al. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 2001; 159: 1079-88.
- 33) 末松 誠, 京兼隆典, 二村雄次, 石村 巽. ヘム分解の生化学から見た人工酸素運搬体の設計戦略. *人工血液* 2000; 8: 40-2.
- 34) Saari M, Vidgren MT, Koskinen MO, Turjanmaa VM, Nieminen MM. Pulmonary distribution and clearance of two beclomethasone liposome formulations in healthy volunteers. *Int J Pharm* 1999; 181: 1-9.
- 35) Desai AG, Thakur ML. Radiopharmaceuticals for spleen and bone marrow studies. *Semin. Nucl Med* 1985; 15: 229-38.
- 36) Scherphof GL, Daemen T, Romero ED, Kamps

- JAAM, Liposome elimination by non-phagocytic cells of the liver. *J Liposome Res* 2000 ; 10 : 431-42.
- 37) 小林紘一. 人工赤血球 (人工酸素運搬体) ②酸素輸送能の評価. *血液・免疫・腫瘍* 2001 ; 6 : 19-28.
- 38) Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, et al. Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjug Chem* 1997 ; 8 : 23-30.
- 39) Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, Tsai AG, Intaglietta M, Tsuchida E. Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 ; 283 : H 1191-99.
- 40) Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Yamamoto M, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit Care Med* 2003 ; (in press).
- 41) Tsuchida E, Ando K, Maejima H, Kawai N, Komatsu T, Takeoka S, et al. Properties of and oxygen binding by albumin-tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivative complexes. *Bioconjug Chem* 1997 ; 8 : 534-8.
- 42) Komatsu T, Hamamatsu K, Wu J, Tsuchida E, Physicochemical properties and O₂-coordination structure of human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) derivatives. *Bioconjug Chem* 1999 ; 10 : 82-6.
- 43) Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E, Effect of heme structure on O₂-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: Intramolecular histidine coordination provides a stable O₂-adduct complex. *Bioconjug Chem* 2002 ; 13 : 397-402.
- 44) Tsuchida E, Komatsu T, Yanagimoto T, Sakai H. Preservation stability and in vivo administration of albumin-heme hybrid solution as an entirely synthetic O₂-carrier. *Polym Adv Tech* 2002 ; 13 : 845-50.
- 45) Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Nakagawa A, Sakai H, Kobayashi K, et al. Human serum albumin incorporating synthetic heme: Red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res* 2003 ; 64 A : 257-61.
- 46) Tsuchida E, Komatsu T, Hamamatsu K, Matsukawa Y, Tajima A, Yoshizu A, 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* 2000 ; 11 : 46-50.
- 47) Kobayashi K, Komatsu T, Iwamaru A, Matsukawa Y, Horinouchi H, Watanabe M, et al. Oxygenation of hypoxic region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res* 2003 ; 64 A : 48-51.
- 48) Contaldo C, Schramm S, Wettstein R, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O₂ affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 ; 285 : H 1140-7.
- 49) Erni D, Wettstein R, Schramm S, Contaldo C, Sakai H, Takeoka S, et al. Normovolemic hemodilution with Hb vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 ; 284 : H 1702-9.
- 50) 高折益彦. 人工血液 (HbV) 安全性, 有効性に関する治験計画. *人工血液* 2002 ; 10 : 99-106.

Journal of Trauma 2003 Jan; 54(1): 133-9, The American Association for the Surgery of Trauma
(出版社: Lippincott Williams & Wilkins, Inc.)

赤血球代替物を用いる蘇生法による外傷後過剰炎症反応の変化

Alteration of the postinjury hyperinflammatory response by means of resuscitation with a red cell substitute.

Johnson JL, Moore EE, Gonzalez RJ, Fedel N, Partrick DA, and Silliman CC.
Department of Surgery, Denver Health Medical Center, Denver, CO 80204, USA.

(訳者) 酒井宏水・土田英俊*
Hiromi Sakai, Eishun Tsuchida

訳者のコメント

北米企業を中心とした修飾Hbの臨床試験は最終段階に到達し、BLA(Biologics License Application)申請した企業もあるが、各種副作用が問題となって開発を中断した企業も続出している。Baxter社が大々的に展開した分子内架橋型Hb(HemAssist, DCLHb)は、血管収縮と血圧亢進、食道の蠕動運動の異常など各種副作用の問題が続出し、また有意な蘇生効果も得られず¹⁾、1998年にPhase III試験の継続を断念したことは本研究領域全体にとって衝撃的な出来事であった。その後Somatogen社を吸収しpoint mutationによりNO結合に対する親和度を低減させたりコンビナントHb分子に更にPEG鎖を結合させた究極的な修飾Hbの開発に移行していたが²⁾、十分な問題解決には至らずBaxter社は2003年に完全撤退を宣言した。他方、Hbを重合して分子量を増大させて血中滞留時間を延長させる試みは、① glutaraldehyde重合ヒトHb (PolyHeme™, Northfield社)、② glutaraldehyde重合ウシHb (Hemopure™, Biopure社)、③ o-raffinose重合ヒトHb (Hemolink™, Hemosol社)が知られている。このうちHemosol社は臨床試験で十分な効果が認められず2003年に中断している。Biopure社のHemopure™は南アフリカで臨床での使用が認可され、昨年東京で開催された第9回血液代替物国際会議でも、乳癌再建手術での使用例の発表があった³⁾。またアメリカで愛玩動物(イヌ)への使用が認められている(Oxyglobin™)。Biopure社の臨床試験結果に関する報文数は業界では最も多く、臨床認可が期待されているが^{4,5)}、狂牛病の問題も絡み否定的な見方もある。

Northfield社のPolyHemeは、グルタルアルデヒド重合ヒトHb(平均分子量150 kDa, [Hb] = 12~14 g/dL, 膠質浸透圧: 20~25 Torr)である。血圧亢進が生起しないことを主張し⁶⁾、臨床試験も順調に進行しているようであるが、臨床試験結果の公表は幾つかのCase Reportに留まっていた^{7,8)}。しかし昨年PolyHemeを重症患者に投与した後の炎症反応の程度を、サイトカイン産生量の測定から評価し、輸血した場合と比較をした内容が発表された。サイトカインは免疫細胞から産生される糖蛋白質群(分子量: 5~100 kDa)の総称であり、細胞間の情報伝達物質として多様な生理活性を有していることから、免疫反応を理解する情報源となる。本論文ではPolyHemeの酸素運搬効果については記述が無く、また被験者数が少ないためデータの統計処理に問題があり決定的なことが言えていない印象が強いが、副作用の多い「輸血」に対する人工酸素運搬体の優位性が主張され、本研究分野全般にとって参考となる文献であると考えられるので以下に紹介したい。

尚、図表は著作権の問題があるので割愛するが、内容は文章から十分に理解できると思われる。興味ある方は原著を一読して頂きたい。

緒言

出血ショック時の蘇生法において最も重要なのは酸素運搬の回復である。一般的には先ず晶質液の投与で循環血液量を回復し、次いで必要に応じて濃厚赤血球(packed red blood cells,

*早稲田大学理工学総合研究センター 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1
Phone, 03-5286-3120; Fax, 03-3205-4740; E-mail, eishun@waseda.jp
論文受付論文受付 2004年1月21日 受理 2004年1月29日

PRBCs)を投与し酸素運搬量の増大をはかる。しかし、PRBCsの予期せぬ様々な副作用も近年特に強く認識されている。輸血の副作用としては主に、感染と免疫炎症反応 (immunoinflammation) がある。

感染症については、HCVやHIV感染の可能性が未だ統計的に残されているように不安が残るし、新たな感染源出現の可能性もある。例えばプリオン (変異クロイツフェルト-ヤコブ病) や人獣共通感染症 (西ナイルなど) 感染の可能性は、今後集中して検討する必要がある。感染回避のために献血者プールを狭めればPRBCsの供給と利用システムへの影響は多大であろう。

ごく最近の配慮すべきこととして、また本研究の課題として、PRBCsの免疫炎症反応がある。輸血に免疫変調作用があることは周知の事であり、事実、臓器移植の歴史の初期では、これが治療のendpointであった。以来、輸血に起因する炎症反応、感染、および腫瘍再発について詳しく報告されている。PRBCsには、酸素運搬の役割だけでなく、生理活性作用もあることは明らかである。

外傷患者が死に至った場合、多臓器不全 (MOF) が原因であることが多い。その詳細な機序は明らかでは無いが、抑制不能な全身的炎症反応がその根本と考えられている。これを裏付ける事実として、好中球 (PMN) 機能と内皮細胞 (EC) 活性の変化がみられた後にMOFが生起することが動物モデルや外傷患者で観察されている。PRBCsに含有する生理活性物質によるPMNまたはECの機能変化が、postinjury MOFへ達する過程に影響を及ぼす。

MOFの原因がPRBCsであることを示唆する例もある。8年前に我々は、外傷後初期の輸血がMOF発生の危険因子であることに気付いた。そして多くの専門分野から構成された研究班を発足し、根本的原因を追求した。最大の焦点は、PRBCs保存中に産生される物質が炎症反応を変化させることであった。ここ10年間の研究結果から、PRBCsに含有する脂質やサイトカインメディエータがPMNとECの生理に変化をもたらすことが明らかとなった。

保存PRBCsの血漿分画は、PMNsとECの両方に対して炎症作用 (proinflammatory effect) を示す。この血漿分画にPMNsを加えインキュベートすると、表面に接着分子 (CD11b/CD18) の発現や、刺激に対する細胞毒性産物 (過酸化水素, エラスターゼ) 産生の亢進などの反応を示した。血漿分画の脂質成分も生理活性を示す。同様にPRBCs由来の脂質メディエータ類似体をECに作用させると、接着分子発現量が増大する。これらの効果は総じてECのPMNに対する親和性を増大させ、またPMNが炎症反応を促進し自己毒性な組織障害をもたらす。外傷時の輸血に関連する刺激/活性化の実験によって、PMN/EC接着とEC障害が結果として得られた。

我々は、外傷患者の蘇生において、PRBCsの代わりに重合ヒトHb (PolyHeme) を使用する機会を得た。重傷患者にこの物質を投与することで、我々は免疫炎症反応についてPRBCsとPolyHemeで比較することが可能となった。このHb利用酸素運

搬体は、脂質成分を含まず、サイトカインも含まず、全てに適合した修飾ヒトHb溶液であり、開発の最終段階にある。In vitro試験では、PolyHemeがPMNを刺激しないこと、またECを活性化しないことが解っている。我々は重合ヒトHbで蘇生した場合にはPMN細胞毒性potentialは安定し、PRBCsで蘇生した場合にはPMN細胞毒性potentialの亢進がみられ、PRBCsが外傷後PMNを刺激する仮説と一致していた。

従来観察されたPMN刺激の相違が全身的な炎症反応の低下を示しているかどうかは不明である。炎症反応の評価法の一部として、proinflammatory (炎症性) サイトカイン (IL-8, IL-6 など) と、免疫調節性 (counterregulatory) サイトカイン (IL-10, IL-11など)、内皮細胞活性化の指標として (可溶性細胞内接着蛋白質: sICAM) および可溶性E-セレクトリン (sE-selectin) を測定した。本研究では、重合ヒトHbで蘇生した場合とPRBCsで蘇生した場合で、サイトカインレベルに相違があるか確認することを目的とした。

方法

患者の選択

輸血が必要と判断された17歳以上の外傷患者を対象とした。我々の従来の危険度検査では、外傷重症度 (injury severity) と投与PRBCsユニット数から判断した外傷の程度がMOF発見の予測因子であったので、このプロスペクティブ臨床研究においても、外傷後12時間以内に6ユニット以上のPRBCs投与を受けると予想されるInjury Severity Score (ISS) が15以上の患者を対象とした。被験者は、重合Hb (20 ユニット以下、或いは1000 g Hb) 或いは貯蔵されていた赤血球を、最初の酸素運搬蘇生液として投与を受けた。24時間生存しなかった患者は対象外とした。本研究は、研究施設評価委員会の承認を得たプロトコルに沿って実施され、また、研究ボランティア保護の原則に従った。

追加輸血必要の目安は、晶質液投与後の低血圧改善が必要となったとき、生理学的に顕著な貧血状態 (例えば酸素抽出率が30%以上) になったとき、或いは極度な貧血 (Hb < 7 g/dL) になったときとした。この措置は両群とも同様に行った。血圧、心拍数、pHなどのパラメータ、輸血量、年齢、およびISSを集計し、MOF研究のデータベースの一部とした。PRBCsは、保存間に白血球除去の処理をしなかった。

採血液検体の調製とサイトカイン測定

ヘパリン加全血を外傷後できるだけ早く採取し (0 hr, 或いはベースライン)、その後の採血時間を3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 120時間とした。3時間以内に採血出来なかった患者は除外した。採血液を遠心分離し (1回目400xg, 20 min, 2回目10000xg x 5 min)、血小板数の少ない血漿を調製した。血漿は直ちに-80℃で凍結し、ELISA測定まで保存した。市販ELISAキット (R&D System, MN) を測定に用いた (IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, sE-selectin, sICAM)。

統計処理

年齢, ISS, 乳酸値, pHについては, 両群間の差はStudent's-t testで判定した. サイトカインレベルに対する経過時間の影響の検討には, 反復測定ANOVAを用いた. 経時的変化におけるベースラインと各測定時間との比較ではScheffe's testを用いた. 2群間 (PolyHeme vs. PRBCs) の比較にはANOVAを用いた. IL-11レベルは検出限界以下になることがあるので, 検定は行わなかった. 全ての比較において, p値が0.05以下のとき有意な差と判断した.

結果

患者の一般状態

全体で25名の患者の結果を最終的に統計処理にかけた. このうち7名がPRBCs投与, 残る18名がPolyHemeの投与を受けた. 年齢, ISS, 最初12時間の最低乳酸値, 最低pH値に特に有意差はなし. PolyHeme群の患者は全て生存した. PRBCs群では2名 (29%) が晩期MOFにより死亡した.

炎症性サイトカイン (IL-8, IL-6)

PRBCs群では外傷後初期に増大した. IL-8は初期値 27.4 ± 10.3 pg/mLから12時間後に最大値 4323.1 ± 2963.1 pg/mLにまで, 120倍増大した. IL-6は初期値 348.8 ± 180.1 pg/mLから6時間後に最大値 6489.5 ± 3468.2 pg/mLまで, 約19倍増大した. 一方, PolyHeme群では, 経時的変化としては有意な上昇が見られたが, 相対的な変化としてはIL-6が5倍, IL-8は12倍の増大に留まり, 僅かであった. IL-6, IL-8ともにPRBCs群の方が有意に高い値を示した.

免疫調節性サイトカイン (IL-10, IL-11)

PRBCs群では, IL-10が 276.1 ± 246.0 pg/mLから3時間後に最大値 552.4 ± 184.2 pg/mLに増大し, 約2倍となった. PolyHeme群では, IL-10は初期値 85.5 ± 18.9 pg/mLから3時間後に最大値 180.2 ± 74.3 pg/mLに増大し, 約2倍となった. 両群とも有意な増大であった. 初期値が両群で大きく異なるが, 有意な差では無かった ($p=0.20$). ANOVAでは, IL-10はPRBCs群がPolyHeme群に比較して有意に高い値となった.

IL-11は, 検出限界以下となるが多かった. 経時的に増大する傾向があり, 初期値 1.0 pg/mLから48時間後に 11.4 pg/mLにまで増大した. しかし, 36, 48時間以外の測定時間では全て検出不能であった. IL-11は僅かに測定できる程度であり, また被験者数も小さいので, 検定はしなかった.

血管内皮障害マーカー (sICAM, sE-selectin)

従来結果と同様, sICAMとsE-selectinは徐々に有意な上昇を示した. sICAMの上昇はPRBCs群で僅かに高い値を示したが, 有意な差ではなかった ($p=0.10$).

論考

保存PRBCsが免疫炎症反応の副作用を起す可能性は, これまでもex vivo試験結果から指摘されている. 我々の研究室で

も, PRBCsが外傷後にPMNを刺激し活性化させ, MOFを引起こす可能性があることに注目してきた. 特に, PolyHemeに比較してPRBCsを投与した患者のPMNsの活性化が非常に高いことをex vivo試験で見出した. 赤血球の代わりにPolyHemeを投与することにより全身の炎症反応を弱めるという我々の仮説は, 今回の追加試験におけるサイトカイン測定の結果と一致している.

炎症性サイトカインIL-8およびIL-6は, PolyHeme群で6~12時間後に僅かな増大がみられる. IL-8はケモカインの一種で, PMNsを刺激して活性化し, 炎症領域への走化性を高める. 外傷後の呼吸不全とMOF発症時にIL-8の急激な増大が見られる. 更に, 保存PRBCsの血漿がex vivoでPMNsからのIL-8産生を刺激することも確認した. PRBCs群で特にIL-8が高いことから, 輸血が外傷後のIL-8産生量を増大させ, 炎症性臓器障害に移行する危険性を増大させることが考えられる. しかし, IL-8の生理活性はIL-8濃度だけでなく, 外傷後に変動する諸要素, 例えばIL-8レセプターの活性なども含めて検討しなければならない. Adamsらによれば, Ca^{2+} Fluxから測定したIL-8に対するPMNsの応答は, 外傷後1週間で大きく変化する. 1日目は鈍い応答を示し, 3日目に最大の応答を示す. 従って正味のIL-8活性は, 血漿中の濃度だけでは正確に示すことは出来ない.

IL-6は炎症性および抗炎症性サイトカインの両性質を有し, 正確な役割は未だ解っていない. 明らかなのは, IL-6の増大は, 外傷または敗血症後の悪い結果の前兆となることである. IL-8と同様, PolyHeme群のIL-6微増は全身的な炎症反応の低下傾向を反映しているのであろう.

外傷に対する反応の一つに, 炎症反応初期の刺激に対する免疫調節反応がある. この反応のメディエータとしてIL-10およびIL-11のサイトカインが推定されている. これらはPMNs, 単球, リンパ球の活性を抑制する. 一般的に, IL-10増大は予後不良の場合に見られる. しかしこれが危機的状態の指標なのか, IL-10の効果なのかは明らかではない. 治療的にIL-10で免疫炎症反応を調節する方法は, 様々な結果をもたらすが, 対照的にIL-11では全身的な炎症反応の治療的調節剤として臨床試験が進められている. 事故による外傷で見られた従来結果と同様, PRBCsで蘇生した患者にIL-10の増大が見られた. PolyHeme投与群では特に外傷後初期に, 統計学的に有意に低いIL-10レベルを示した. 従って, 外傷初期の炎症反応が増大する時期に, PRBCsの代わりにPolyHemeを投与すると, 免疫調節機能が鈍化したことを示唆する. IL-11は両群ともに増大する傾向があった. しかし濃度が極めて低く, 恐らく生理的にも意味のあるレベルでは無いと考えられ, これ以上の議論は余り意味が無いと考えられた.

サイトカイン産生の様相はPRBCs群とPolyHeme群で異なり, また以前にex vivo試験でもEC活性が異なることが明らかになったが, 今回ECの活性化/障害を反映するマーカー (sICAM/sE-selectin) には両群で有意な差は見られなかった. PRBCs群の被験者数が少ない事も原因の一つであるが, 事実, 大差は無いと判断すべきと思われる. サイトカインとPMNの

機能の測定から全身的な炎症反応の低下の証拠は得られたが、マーカーと内皮障害/活性化には変化が無い。

本研究ではデータ解釈に限界がある。まず第一に、初期値で両群に有意な差は見られないものの、PRBCs群の患者の方がより重度の障害と生理的な乱れがあること、また被験者数が少ないことである。第二に、PRBCs群の炎症反応の増大は、PRBCs保存中に産生された炎症惹起物質が、外傷後の炎症反応に対して火に油を注いだものと考えた。このことは、保存PRBCs中の血漿がPMNの機能に及ぼした我々の従来結果と一致している。他に考慮すべきことは、PMN機能評価ex vivo試験では明らかではなかったが、PolyHemeはin vivoで免疫調節機能を有することが考えられる。この場合、PRBCsの充進作用というよりは、PolyHemeの抑制作用が両群間の差の原因とも考えられる。本研究の結果からは判断できないが、過去にPolyHemeの投与を受けた患者が、ex vivoでPMNの感作物質に対して正常な反応を示している。従ってPolyHemeの拮抗性効果よりも、PRBCsの作動性効果が有力である。第三に、解釈上、患者のサイトカインは内因性と仮定した。しかし、白血球除去に依らず血液製剤保存中に何らかのサイトカインの産生はある筈である。これは非溶血性輸血反応の機序の一つと考えられてきたが、このような反応を示す患者で見られたサイトカインレベル上昇を説明することが出来ない。それに、本研究の患者のサイトカイン上昇は、保存物に含まれるサイトカイン濃度(文献値)よりも著しく高い。従ってほとんどの場合、内因性サイトカインの測定値であったと考えるべきである。また、PRBCs由来であれ内因性であれ、患者のサイトカインレベルは十分に生理活性を示す量であると考えられる。

これまでに幾つもの興味ある研究が、外傷後投与したPRBCsが抑制不能な全身的炎症反応を充進する可能性があることを指摘している。我々はPolyHemeの使用により、外傷後初期の段階でPRBCsの投与を回避した患者の炎症反応を比較検討することが出来た。PRBCsの代わりにPolyHemeを投与した患者の方が、炎症性および調節性サイトカインともに低レベルを示した。従って、外傷後MOFへ移行する可能性を低下させることになるであろう。

訳者コメントの引用文献

[1] Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J,

Mallory MN, Rodman G Jr. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. JAMA. 1999 17;282: 1857-64.

- [2] Bobofchak KM, Mito T, Texel SJ, Bellelli A, Nemoto M, Traystman RJ, Koehler RC, Brinigar WS, Fronticelli C. A recombinant polymeric hemoglobin with conformational, functional, and physiological characteristics of an in vivo O₂ transporter. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285: H549 - 561.
- [3] Edwards G, Levien L, Benn C. Oxygen therapeutic Hemopure in Breast Cancer Reconstructive Surgery. 人工血液 2003;11:38
- [4] Sprung J, Kindscher JD, Wahr JA, Levy JH, Monk TG, Moritz MW, O'Hara PJ. The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. Anesth Analg. 2002;94:799-808.
- [5] Levy JH, Goodnough LT, Greilich PE, Parr GV, Stewart RW, Gratz I, Wahr J, Williams J, Comunale ME, Doblard D, Silvay G, Cohen M, Jahr JS, Vlahakes GJ. Polymerized bovine hemoglobin solution as a replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002;124:35-42
- [6] Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, DeWoskin R, Moss GS. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergency surgery. J Am Coll Surg 1998; 187:113-122.
- [7] Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Ness PM, Norris EJ, Carson JL, Hides GA, Freeman IH, DeWoskin R, Moss GS. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. J Am Coll Surg. 2002;195:445-52.
- [8] Norris EJ, Ness PM, Williams GM. Use of a human polymerized hemoglobin solution as an adjunct to acute normovolemic hemodilution during complex abdominal aortic reconstruction. J Clin Anesth. 2003; 15: 220-3.

酸素輸液の安全性と人工赤血球としての効果



早稲田大学 理工学総合研究センター
土田 英俊

●土田先生のプロフィール
早稲田大学大学院、工学博士。早稲田大学名誉教授。日本血液代替物学会前会長。日本化学会学術賞、高分子科学功績賞などを受賞、1998年紫綬褒章受章。

新着想への積極的支援を！

先頃、仙台で開催された日本人工臓器学会第四十一年会において、元会長の渥美和彦教授から「国際的に見た我が国の優れた人工臓器研究の歴史」について講演があった。

この分野は既に一九六〇年代から我が国で活発な展開となり、その積極果敢な試行情報は世界の先導的役割を果たし、具体例を挙げ説明された。

当時新進気鋭の研究者として渥美先生ご自身が「医用電子」の分野開拓を担当されたのが大変革を遂げ、今日の医療と成っているのはよく知られている。

世界への発信が刺激となり実現したのではあるが、日本が具体的貢献と認められている実例は、発信数に比較し

残念ながら少数に留まっている、この事実をどうみるべきか。

「過去を省みて思うことは、緊急課題や興味ある具現性の高い新着想には思い切った支援措置（技術協力、経済支援）を惜しまない、更には民間団体も含め、産官学の協力など 地方自治体参加による共同、国際協力なども含め、積極態勢を強力にすることが肝要で、今後そのような組織強化を計りたい」と、渥美教授は結ばれた。

実は渥美先生より、講演で人工赤血球の近況紹介をしたい、最近の進歩を示す図表が欲しいとのことで、早速お届けし話題提供に利用戴いた。

本稿では紙数がきわめて限られているので要旨を絞り、酸素輸液としての（ヘモグロビン小胞体）および（アルブミン）への研究の現況を報告して、読者の御関心に込めたい。

酸素輸液の実現に向けて

「生理塩水にヘム脂質誘導体を分散させ、空気を曝すると赤色溶液となる」この発見が、可逆的に酸素の結合解離を私共の研究室で観測した世界で最初の例（一九八三年）。

これを契機に、分子集合科学と高分子錯体科学を基礎とした酸素輸液実現の絶え間ない努力が、漸く最近になって満足できる機能と物性値を持つ物質

系が特定できた。この場合の要求項目は、投与による急性低酸素症からの蘇生は当然として、

- 人体投与して安定（安全）
 - 血液型と感染の心配が無い
 - 溶液粘弾性や膠質浸透圧がヒト血液と同等に調製できる
 - 緊急時に人体換算で二〜三リットルの投与でも毒性が低く代謝排泄容易
 - 製造経費（原価）も安価で且つ長期間保存が可能
- などの特徴が期待されている。

ヘモグロビン小胞体の製造

日赤輸血センターから期限切れ献血血液の提供を受け、加熱処理と限外濾過膜処理を経て、ヒトヘモグロビン（Hb）溶液を厳密に精製する。

精製ヒトヘモグロビンは血液型物質や異種蛋白質を一切含まない。この高濃度精製ヒトヘモグロビンを脂質二分子層膜で被覆したのがヘモグロビン小胞体（HbV：粒径二五〇ナノメートル）である（図一）。

ヘモグロビン小胞体の溶液物性は、血液と同等に調節する。水溶性高分子で粒子表面を修飾すると分散安定度が向上し、凝集融合なしで、室温下に二年間保存可能となる。

動物投与試験では血液希釈や出血ショック蘇生液としての効果が実証され、

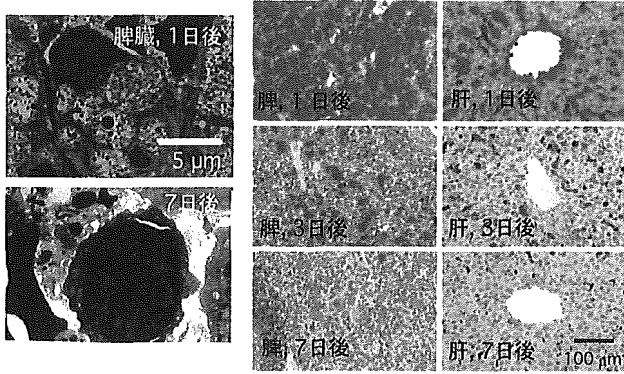


図2.ヘモグロビン小胞体の肝・脾代謝過程。

(左) Hb小胞体投与後のmacrophageの透過型電子顕微鏡写真(Rat脾)。食胞(phagosome)中にHb小胞体粒子多数を認め、7日後にほぼ消失。(右) Hb小胞体投与後ラット肝・脾の顕微鏡写真。抗ヒトHb抗体染色による赤染はヒトHbの存在部位を示す。投与1日後で多量のHbの存在を認めるが、7日後には殆ど消失、蓄積は全く認めない。

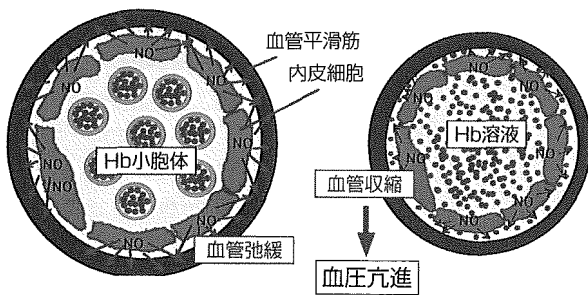


図3.小動脈(内径約150μm)の断面図

Hb分子は血管内皮と平滑筋の間にまで浸透し、血管内皮弛緩因子(NO)を捕捉するため血管が収縮(径の縮小はこの場合1/3)、血圧が上昇する。Hb小胞体ではそのようなことはない。

アルブミン-ヘムは、赤血球代替物としてだけではなく、酸素治療法(腫瘍酸素化など)にも有効である。体内分布や代謝過程など安全性に関する知見も集積されており、間もなく最適分子構造も確定される見通しである。

本研究の最終展開はアルブミン-ヘムと遺伝子組み替えヘモグロビン小胞体として完成、上市させることを目標としている。

現在、ニプロ(株)(佐野 實社 長) 医薬品研究所(佐藤 誠 所 長)が臨床を目指した展開を強力に推進中である。

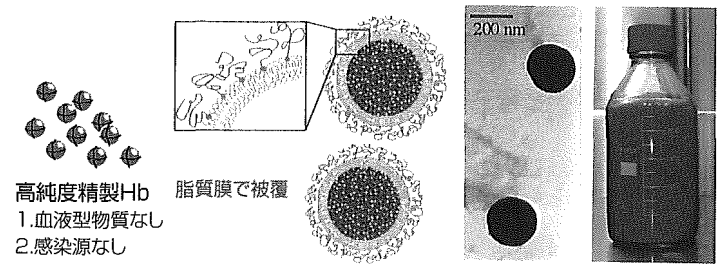


図4.ヘモグロビン小胞体(電顕観察:揃った粒径250nmφを確認)。

アルブミン-ヘムの有効性

本邦でも遺伝子組み替えアルブミン(HSA)の生産が進行している。興味深いことに、アルブミン1分子当たり、分子内塩基型ヘム誘導体八個を包接でき、

安全性に関しても、体内動態、細網内皮系への捕捉と代謝(図2)、血液生化学、血液凝固などの検査項目に問題は無い、霊長類への投与試験でも安全性と性能は既に確認されている。

ヘモグロビン小胞体投与は血管収縮を生起せず(図3)、血液循環維持と組織酸素化に有効である。現在GMP基準に沿って製造と臨床試験開始の準備を進めている。

このアルブミン-ヘム(HSA-heme)が酸素輸液としても機能する(図4)。

ヒトヘモグロビンは血管内皮由来弛緩因子(NO)を捕集し、血管収縮(血圧亢進)をもたらす。アルブミンは周知のように等電点(pI:4.8)であり、血管壁透過度はヒトヘモグロビンの百分の一程度と低く、血管収縮は全く生起しない。

アルブミンは血管内許容濃度5%を超えると膠質浸透圧が通常の生理条件を逸脱するので、酸素運搬量増大にはアルブミン二量体を用いた膠質浸透圧の調節が有効であり、二量体は合計十六個のヘム誘導体を包接(酸素運搬量は二倍)となる(図5)。

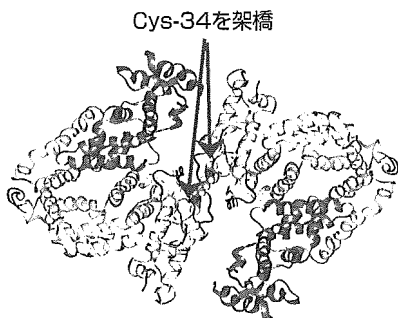


図5.二量体rHSAの構造。

この場合は膠質浸透圧は20Torr(HSA 5%溶液と同じ)を維持したまま、酸素運搬量が二倍となる。二量体では分子量増大に応じた血中半減期の延長が可能。

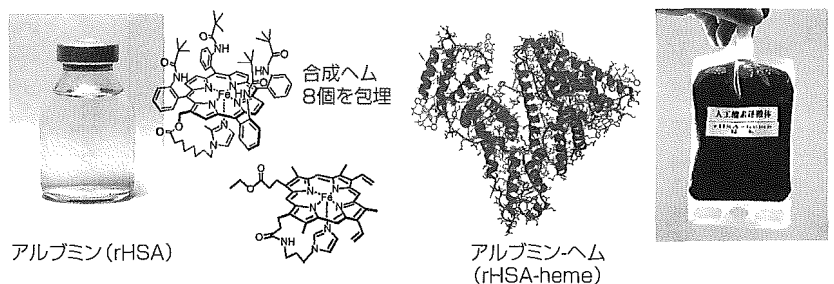


図4.ヒトアルブミン(HSA)1分子当たり、分子内塩基型ヘム誘導体の8個が包接可能。

このアルブミン-ヘムは酸素輸液系として機能(血液と同じ赤色となる)。

Safety Evaluation of an Artificial O₂ Carrier as a Red Blood Cell Substitute by Blood Biochemical Tests and Histopathology Observations

YUBIN HUANG,* TERUYUKI KOMATSU,* HISASHI YAMAMOTO,† HIROHISA HORINOCHI,‡ KOJICHI KOBAYASHI,‡ AND EISHUN TSUCHIDA*

Recombinant human serum albumin (rHSA) incorporating synthetic heme with a covalently linked proximal base (albumin-heme [rHSA-heme]) is an artificial O₂ carrier that can transport O₂ like hemoglobin does in the blood stream. To evaluate the clinical safety of this compound, 20% and 40% exchange transfusions with rHSA-heme into anesthetized rats were followed by blood biochemical tests and histopathologic observations for 7 days. In the 20% rHSA-heme group, a total of 30 analytes by blood biochemical tests showed almost the same values as those observed in the reference 20% rHSA group. Although some abnormal values for liver parameters were found in the 40% rHSA-heme group, they returned to normal after 7 days. Histopathologic observations indicated that the administration of rHSA-heme in a volume of 20% total blood volume did not produce any negative side effects on the vital organs. *ASAIO Journal* 2004; 50:525–529.

Hemoglobin (Hb)-based O₂ carriers have been studied as red blood cell substitutes or as an O₂ therapeutic.^{1–3} The advantages of these O₂ carriers are 1) the absence of a blood type antigen and infectious virus, 2) a small particle size for penetration through constricted vessels where red blood cells cannot penetrate, and 3) stability for long-term storage. The first generation products (Hemolink, Polyheme, and Hemopure),⁴ which are currently in clinical testing, have been followed by second generation materials (Hemospan™ [MP4],⁵ adenosine-GSH-Hb,⁶ and SOD-catalase-Hb⁷) under development. We have developed an entirely synthetic O₂ carrier without using Hb. Recombinant human serum albumin (rHSA) incorporates a synthetic heme (2-[8-(N-(2-methylimidazolyl)octanoyloxymethyl)-5,10,15,20-tetrakis(α,α,α,α-(1-methylcyclohexanamido))phenylporphyratoiron(II)

(Figure 1), providing an artificial hemoprotein (albumin-heme [rHSA-heme]), which has the potential to bind and release O₂ under physiologic conditions (pH 7.3, 37°C) in the same manner as Hb.^{8–12} Because the rHSA-heme molecule is totally synthetic, there is absolutely no concern for infection with pathogens and virus. The *in vitro* experiments have indicated that the rHSA-heme solutions have a high compatibility with blood cell components.¹² Furthermore, we found that vasoconstriction was not observed after administration of rHSA-heme into the circulatory system because of its low permeability through the vascular endothelium; rHSA-heme does not deplete nitric oxide (endothelium-derived relaxing factor).¹³ Our recent study of a 30% exchange transfusion with rHSA-heme after 70% hemodilution with 5% (by weight) rHSA in anesthetized rats showed that injection of this material improved the circulatory blood volume and resuscitated the animals from shock.¹⁴ To evaluate the clinical safety of this material as a red blood cell substitute, 20% and 40% exchange transfusions in anesthetized rats were studied using blood biochemical testing and histopathologic observations for 7 days.

Materials and Methods

Preparation of rHSA-Heme

The rHSA (Albrec, 25% by weight) was provided by the NIPRO Corp. (Osaka, Japan). The rHSA-heme solution (rHSA: 4.9% rHSA by weight, pH 7.45; heme: 2.8 mmol/L heme, colloid osmotic pressure (COP) 18 torr, osmolarity 300 mOsm, viscosity 1.1 cP, and endotoxin <0.1 EU/ml) was prepared according to our previously reported procedure.^{10,14,15} The other physicochemical properties of rHSA-heme (molecular weight 72.3 kDa, O₂ binding affinity [$p_{1/2}O_2$] 37 torr, and isoelectric point 4.8) have been reported elsewhere.¹⁰ The half-life of the oxygenated rHSA-heme against the ferric state was 9 hours at 37°C *in vitro*.¹⁰

Exchange Transfusion with rHSA-Heme in Anesthetized Rats

The investigations were carried out in 60 male Wister rats (312 ± 3.0 gm). The details of the experimental setup (anesthesia and catheterization) were the same as our former protocol reported elsewhere.^{14,15} The total blood volume of a rat was estimated to be 64 ml/kg body weight. The 20% exchange transfusion was achieved by four cycles of repeated blood withdrawal via the common carotid artery (1 ml, 1 ml/min) and the rHSA-heme infusion into the femoral vein (1 ml, 1 ml/min; 20% rHSA-heme group, n = 12). The 40% exchange transfu-

From the *Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo; the †Pharmaceutical Research Center, NIPRO Corp., Kusatsu-shi, Shiga; and the ‡Department of General Thoracic Surgery, School of Medicine, Keio University, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

Submitted for consideration June 2004; accepted for publication in revised form August 2004.

This work was partially supported by a grant-in-aid for scientific research (No. 16350093) from JSPS, a grant-in-aid for exploratory research (No. 16655049) from MEXT Japan, and health science research grants (regulatory science) from MHLW Japan.

Address correspondence to: Eishun Tsuchida, Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan.

DOI: 10.1097/01.MAT.0000144361.60280.DA

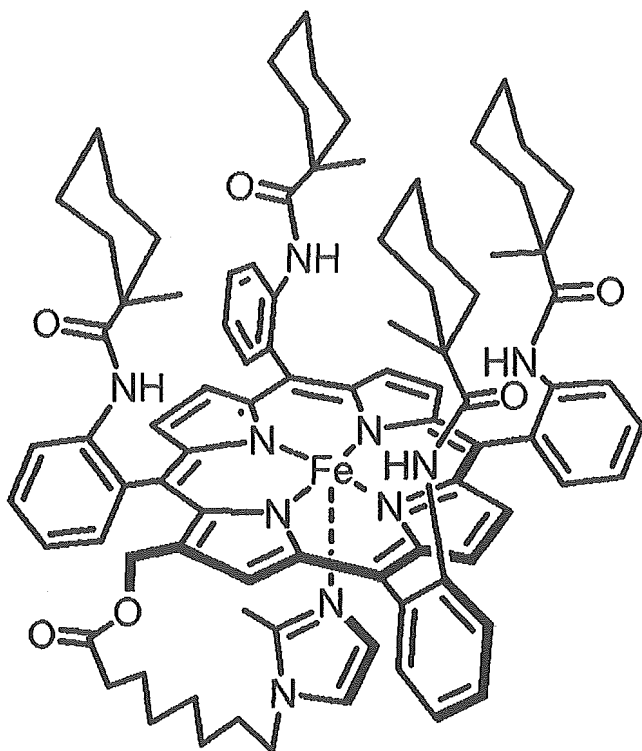


Figure 1. Chemical compound of entirely synthetic O₂ carrier without using Hb.

sion was performed by eight cycles of identical withdrawal/infusion (40% rHSA-heme group, $n = 12$). As a reference, a 5 gm/dl rHSA solution was given to other rats in the same ratios (20% rHSA group and 40% rHSA group, $n = 12$ each). Furthermore, 12 rats without blood exchange (anesthesia and surgery only) were also used as the control group. After the blood exchange transfusion, the animals were sutured and returned to their home cages. Their appearance and body weights were observed on days 1, 3, and 7 after surgery.

After days 1 and 7, 4 ml of venous blood was taken from 6 rats in each group and centrifuged at 4°C (Beckman Coulter Co., Optima LE-80K for 3,500 rpm, 10 min). The plasma phase was frozen (-20°C) for the blood biochemical tests. The rats were sacrificed by venesection and the weights of the isolated liver, kidney, spleen, lung, and heart were measured. All animal handling and care were in accordance with NIH guidelines. The protocol details were approved by the Animal Care and Use Committee of Keio University.

Blood Biochemical Tests

A total of 30 analytes (total protein, albumin, albumin-globulin ratio, aspartate aminotransferase [AST], alanine aminotransferase [ALT], lactate dehydrogenase [LDH], alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase, leucine aminopeptidase [LAP], choline esterase, total bilirubin, direct bilirubin, creatinine, blood urea nitrogen, uric acid, amylase, lipase, creatine phosphokinase, total cholesterol, free cholesterol, cholesterol ester [EChol], β -lipoprotein, high density lipoprotein [HDL] cholesterol, neutral fat [*i.e.*, triglyceride, TG], total lipid, free fatty acid, phospholipids [PhL], K⁺, Ca²⁺, and Fe³⁺) were measured by the Kyoto Microorganism Institute (Kyoto, Japan).

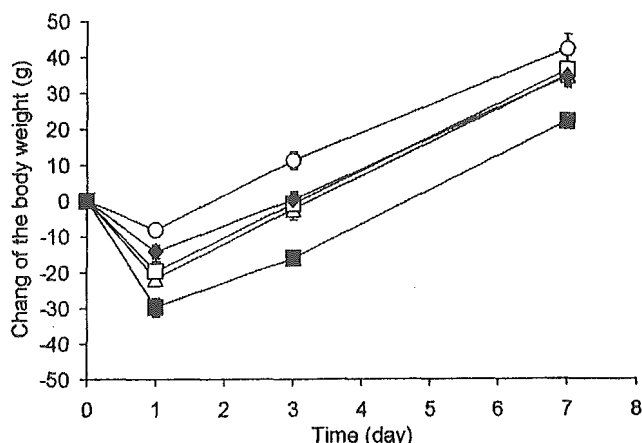


Figure 2. Body weight changes in male Wistar rats subjected to 20% and 40% blood exchange with recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme solutions. Each value represents the mean \pm SEM. ○, Control group; ◆, 20% rHSA-heme group; △, 20% rHSA group; ■, 40% rHSA-heme group; and □, 40% rHSA group.

Histopathologic Observations

Paraffin sections were prepared from the 10% formalin fixed organs and stained with hematoxylin-eosin stain and Berlin blue. All histopathologic observations were carried out by Panapharm Laboratories Co., Ltd. (Kumamoto, Japan).

Data Analysis

The data for increased body weight, organ weight, and blood biochemical tests are expressed as mean \pm SEM. A statistical analysis was performed using the Bartlett test followed by the Tukey-Kramer multiple comparison test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The statistical analytical software was StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

Appearance and Body Weight

In the control, 20% rHSA, and 20% and 40% rHSA-heme groups, all animals survived for 7 days without any change in their appearance and behavior. In contrast, one rat died after 3 days in the 40% rHSA group; the remaining five rats in this group did survive for 7 days.

In the control group, the change in body weight from the basal value decreased by 8.3 ± 1.5 gm after 1 day (**Figure 2**). However, it increased to 11.2 ± 2.4 gm after 3 days and to 42.1 ± 4.3 gm after 7 days.

In the 20% and 40% rHSA groups, body weights decreased by 21.8 ± 1.8 gm and 19.6 ± 2.8 gm, respectively, after 1 day, but they returned to basal levels after 3 days and increased to 34.9 ± 2.9 gm and 36.3 ± 4.0 gm, respectively, after 7 days.

In the 20% rHSA-heme group, body weight decreased by 14.3 ± 1.8 gm after 1 day. It recovered to the starting level after 3 days and increased to 34.9 ± 2.9 gm after 7 days. This change was almost the same as those observed in the 20% and 40% rHSA groups. In the 40% rHSA-heme group, the weight declined by 29.8 ± 2.5 gm after 1 day. Although it increased to 22.1 ± 2.1 gm after 7 days, the differences from the other groups were constant during the experimental period.

Weight of Vital Organs

We could not find any remarkable difference in the weights of the vital organs of the 20% rHSA and 20% rHSA-heme groups compared with the control group, except for spleen weight (**Figure 3**). Spleen weight was significantly increased in the 20% rHSA group after 1 and 7 days and in the 20% rHSA-heme group after 7 days.

In the 40% rHSA group, liver weight was significantly decreased after 1 day, and spleen weight increased after 7 days compared with that in the control group. In the 40% rHSA-heme group, spleen weight was significantly increased after 1 and 7 days *versus* the control group. There was no remarkable change in the weights of lungs, heart, liver, and kidney.

Blood Biochemical Tests

The 30 analytes from the blood biochemical tests of rat plasma are summarized in **Figure 4**. In the 20% and 40% rHSA groups, most of the parameters did not show any significant difference *versus* the control group, except for the iron decrease in the 20% rHSA group after 1 day and the choline esterase decrease after 7 days.

In the 20% rHSA-heme group, the decreases in LAP, TG, total lipid, PhL and iron after 1 day were significant compared with values in the control group. After 7 days, all analytes returned to the same levels as in the control group. With respect to the 20% rHSA group, the decrease in PhL after 1 day and the decrease in iron after 7 days were significant. In the 40% rHSA-heme group, the increase in total protein and AST and the decrease in total cholesterol, EChol, HDL cholesterol, and total lipid after 1 day were significant relative to the control group. Moreover, large increases in ALT and LDH were observed in three of the six samples. In comparison with the 40% rHSA group, the increase in LDH after 1 day, the decrease in EChol and HDL cholesterol after 1 day, the increase in HDL cholesterol after 7 days, and the decrease in TG after 7 days were significant.

Histopathologic Observations

A mild or moderate extramedullary hematopoiesis in the spleen was often found in all groups after the surgical opera-

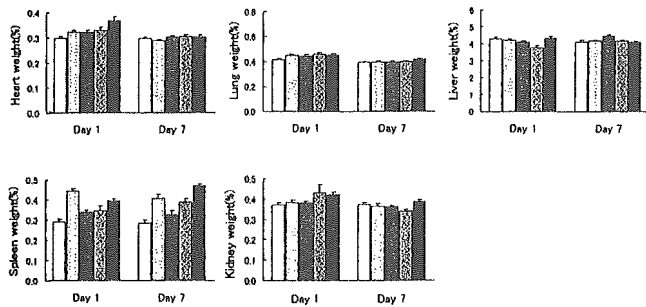


Figure 3. Relative organ weights (as a percentage of body weight) in male Wistar rats subjected to 20% and 40% blood exchange with recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme solutions. Each value represents the mean \pm SEM. □, Control group; ▤, 20% rHSA group; ▥, 20% rHSA-heme group; ▦, 40% rHSA group; and ▧, 40% rHSA-heme group.

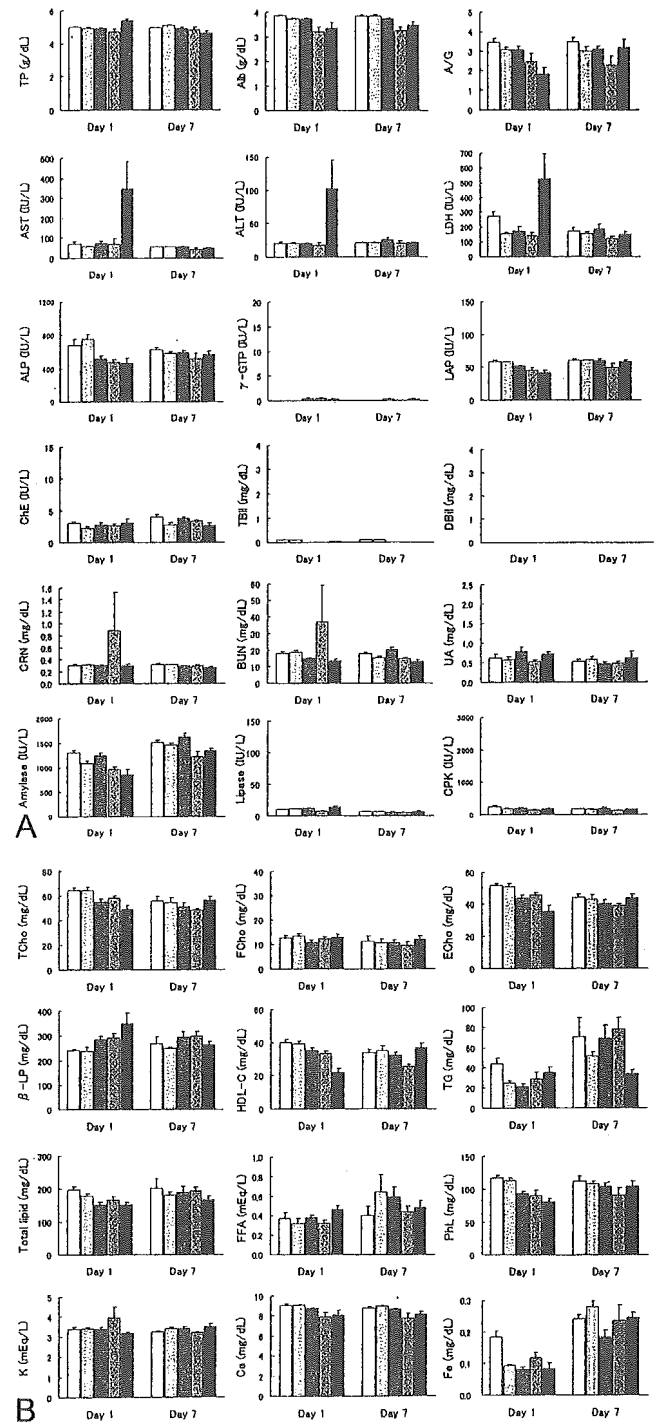


Figure 4. Blood biochemical tests of rat plasma after 20% and 40% blood exchange with recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme solutions after 1 and 7 days. Each value represents the mean \pm SEM. □, Control group; ▤, 20% rHSA group; ▥, 20% rHSA-heme group; ▦, 40% rHSA group; and ▧, 40% rHSA-heme group.

tion at 7 days. In the 20% rHSA group, a slight erythrophagocytosis in the Kupffer cells of the liver (three samples) was observed after 7 days. In the 40% rHSA group, slight mineralization in the tubule of the kidney (three samples) after 1 day and a mild hyaline droplet in the tubule epithelial cells of the

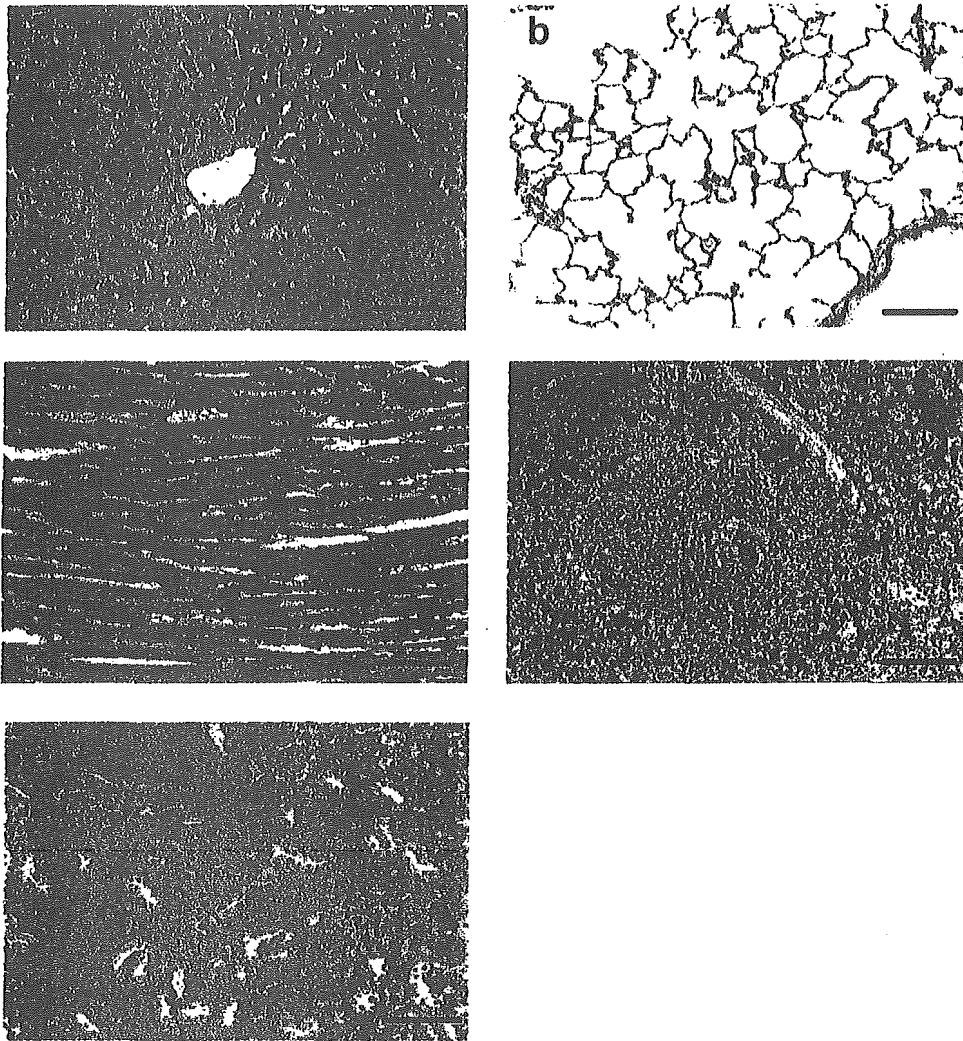


Figure 5. Microscopic observations of stained specimens of organs recovered from a rat 1 day after a 20% exchange with recombinant human serum albumin-heme. Bars = 100 μ m, hematoxylin-eosin stain: a, liver; b, lung; c, heart; d, spleen; and e, kidney.

kidney (three samples) after 7 days were observed. There was no remarkable change in the lung, heart, and spleen.

In the 20% rHSA-heme group, a mild cellular infiltration in macrophages and a mild vacuolization in the Kupffer cells/macrophages of the liver were found in all six samples after 1 day (Figure 5). A mild brown pigment deposition appeared in the Kupffer cells/macrophages of the liver (five samples) after 7 days. There was no change in the heart, lung, and kidney. In the 40% rHSA-heme group, mild focal necrosis in the hepatocytes was visible in six samples after 1 day. The mild brown pigment deposition in the Kupffer cells/macrophages of the liver was also observed after 1 and 7 days. The mild hyaline droplet in the tubule epithelial cells in the kidney (three samples) was sometimes seen. There was no unusual change in the heart and lung.

Discussion

In the control group, although anesthesia and the surgical operation temporarily decreased the body weight of the animals after 1 day, it exceeded basal values after 3 days. The somewhat larger declines in body weight after the exchange transfusion with rHSA or rHSA-heme solution compared with the control group are considered to be the effect of hemodi-

lution. To produce Hb, the iron concentration was reduced by consumption after 1 day. The decreased body weight increased at almost the same rate in all groups, and iron concentrations returned to control levels after 7 days.

The decrease in LAP, TG, total lipid, PhL, and iron in the 20% rHSA-heme group could not be related to acute toxicity. In addition, the mild cellular infiltration in macrophages and the mild vacuolization of Kupffer cells/macrophages in the liver observed after 1 day are considered to be a nonspecific biologic reaction to removal of the rHSA-heme, which was recognized to be an exogenous compound. More recently, we have found that >90% of the heme from the rHSA-heme is captured by the liver with high selectivity (Y. Huang *et al.*, unpublished data). After 7 days, a brown pigment deposit appeared in the Kupffer cells/macrophages of the liver. It gradually became fainter and finally disappeared after 2 months. If the heme is decomposed by hemeoxygenase in the same manner as protoheme IX from Hb, hemosiderin including free iron can be observed by Berlin blue staining. Contrary to our expectation, there was a very slight signal with the Berlin blue stain in the macrophages. We can conclude that the 20% blood exchange with the rHSA-heme solution did not produce any negative side effects in the rats.