

出血性ショック蘇生試験

実験法は既報(Sakai et al., 2004)に従った。Wistar rat (約250g, ♂)にsevoflurane(1.5%)を吸入させ麻酔状態とし、自発呼吸を維持した。頸動脈、頸静脈にカテーテルを留置した。ラットの全血液量は56 mL/kgと仮定し、28mL/kg(約8.4 mL/匹)を1ml/minの速度で頸動脈より脱血した。脱血後15分間放置してから試料を頸静脈から投与した。投与試料は、酸素を結合した洗浄赤血球(RBC-HbO₂群, [Hb] = 8.6 g/dL)、COを結合した洗浄赤血球(RBC-HbCO群, [Hb] = 8.6 g/dL)の2群である(n = 8)。投与後6時間まで血行動態、血液ガス組成、HbCOレベルの推移を観察した。測定ポイントは、脱血前、脱血後、投与直後、0.5, 1, 3, 6 時間後とした。計測終了後直ちに開腹し下大静脈から血液を6mL程度採取、採血管に入れて遠心分離し血漿を得て、血液生化学的検査を実施した(BML社依頼)。本研究では、肝機能を反映する項目としてAlanine aminotransferase (ALT) および Aspartate aminotransferase (AST)について注目した。

(文献)

Sakai et al., Crit. Care Med. 2004;33:806-12.

C. 結果

Fig.1に血圧、血液ガス組成、ヘマトクリット(Hct)値の推移を示した。両群ともに同等の推移を示した。血圧は脱血前に100mmHg程度であったが、脱血後に30 mmHg程度にまで低下した。投与直後に85-90mmHgにまで回復し、その後6時間80mmHg付近を推移した。Hctは、脱血前約43%であるが、脱血後に約35%に低下した。蘇生液のHb濃度が8.6 g/dLであり全血液

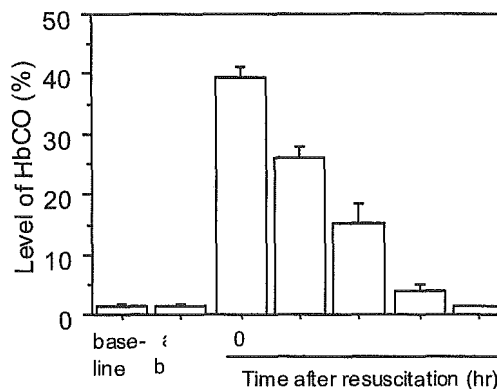


Figure 2. Level of HbCO in the blood of the RBC-HbCO group (n = 8).

の濃度よりも低い為、蘇生直後のHctに著変は無かった。血液ガス組成については、脱血後に代償機能によりPaO₂の上昇、PaCO₂の低下、またpHの低下と乳酸値の上昇が見られた。蘇生液の投与直後に、両群に関してPaO₂、PaCO₂が初期値にまで回復した。pH値は投与直後に最低値を示した。また乳酸値も投与直後には回復しなかったが、1時間後には初期値まで回復し、6時間まで推移した。pH、乳酸値の回復の遅れは、投与直後に末梢微小循環が回復に向い、蓄積していた代謝産物がwash outされたために見られた現象である。

Fig. 2にRBC-HbCO群の血中HbCOレベルの推移を示した。投与前は1.6±0.3%であったが、投与直後に39.3±2.0%を示した。その後、経時的に低下し、1時間後には15.3±3.0%、6時間後には1.3±0.3%で投与前のレベルにまで低下し、ほぼ完全にCOが放出していた。

6時間経過後のAST値、ALT値の結果をFig.3に示す。RBC-HbO₂群、RBC-HbCO群のAST値はそれぞれ211±109U/L、126±54U/Lであり、

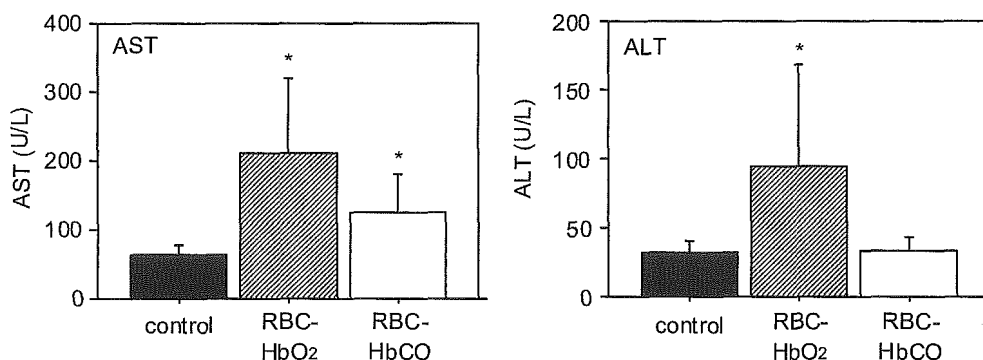


Figure 3. Levels of AST and ALT 6hrs after resuscitation with RBC-O₂ or RBC-HbCO (n = 8). * p < 0.05 vs. control.

control群の 64 ± 13 U/Lよりも高い値となったが、RBC-HbCO群の方が低い値を示した。また、ALT値はRBC-HbO₂群、RBC-HbCO群それぞれ、 95 ± 73 U/L、 33 ± 9 U/Lとなり、RBC-HbO₂群はcontrol値 32 ± 8 U/Lに比較して極めて高い値になっていたが、RBC-HbCO群ではほぼ同等の値にまで低下していた。

D. 考察

COを結合した赤血球を投与したところ、HbCOのレベルは投与直後39%であったが、6時間以内にほぼ完全に放出されることが明らかになった。一般にCOガス中毒とは、COガスに長時間曝された場合に生体内にCOが蓄積されていく過程で生じ、生命が危険な状態に至る。例えば、気中CO濃度が僅か0.05%でも4時間曝されると血中HbCOは40%に到達し、昏睡状態に陥る。本動物実験の場合、ラットはCOを含まない空気を吸入しているので、投与された血中COは体内で薬理効果を示した後、最終定期には肺を経由して呼気として体外に速やかに排出される。HbCO錯体の安定度定数はHbO₂の約200倍であるが配位子の結合は濃度に依存した平衡反応であり、血中ではO₂濃度が圧倒的に高いため、HbCOは次第にHbO₂に変換されたものと考えられる。図1に示すように、投与後6時間までの間、両群に血行動態、血液ガス組成には顕著な差は無く、COガスの毒性を表す変化は確認されなかった。

出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流を意味し、活性酸素の産生による様々な障害、いわゆる虚血再灌流障害、更には多臓器不全に繋がる可能性がある。一般的に虚血状態では細胞内ATPが代謝されてヒポキサンチンになり、これが組織内に高濃度で蓄積する。ここに再灌流により酸素が供給されるとキサンチンオキシダーゼの作用により活性酸素(スーパーオキシド)が多量に発生する。また、マクロファージが活性化されて炎症性サイトカインを産生し、これに反応して好中球などが遊走される。各種接着因子も誘導され、好中球は血管内皮細胞に接着し、更に血管外組織にまで浸潤する。ここに再灌流により酸素が供給されると、好中球細胞膜にあるNADPH-オキシダーゼが大量の活性酸素を産生する。従って、出血性ショックに対する蘇生として輸血すること

は、初期の状態においては生体に対し酸素を過剰に供給して活性酸素産生を促し、虚血再灌流障害を助長させる可能性がある。従って、COが結合したRBC-HbCOを投与することは、酸素運搬機能が初期は抑制され循環血液量の回復と血液粘弾性の維持にのみ寄与し、次第に酸素運搬機能が増大するので、理想的な蘇生液なのかも知れない。

またCOの放出により、血管拡張効果が期待出来る。その機序としては、①COが血管壁平滑筋にあるグアニル酸シクラーゼ(GC)に直接結合して血管拡張し、末梢血流を改善する、また、②正常組織では血管弛緩因子であるNOがミオグロビン(Mb)と反応して失活する経路が存在するが、このとき投与COがMbに結合することにより、NOの失活が抑制される。GCに対する作用はCOよりもNOの方が数千倍強力であり、血管拡張により末梢血流を改善する。そして、③末梢血流の改善は、代謝産物の除去と酸素供給を促進することになる。

一般的にASTは、心筋、肝、脳に高濃度に存在し、ついで骨格筋、腎などに多く含まれる。また、ALTは肝臓に最も多く含まれ、以下は腎、心筋、骨格筋の順番である。臨床的には、AST、ALTの上昇は主に肝疾患の時に見られる。従って、AST値およびALT値が著明に増大した事実から、出血性ショックによる虚血と酸素を結合したRBC-HbO₂の投与による再灌流の結果、肝臓に虚血再灌流障害が生じた可能性がある。一方でCOを結合したRBC-HbCOの投与ではこれが低減されたと考えられる。

D. 結論

COを結合した赤血球を出血ショック蘇生液として投与することにより、虚血再灌流障害を低減する効果が得られることが明らかになって来た。今後は、毒性の視点も加え総合的に至適CO投与量を決定すること、およびCOの薬理効果の機序を特定する必要がある。現行の濃厚赤血球は保存期限が僅か3週間であるのに対し、COを結合させ完全に酸素を遮断することにより保存安定度の向上が得られることも報告されている。またCOガスは化学的に安定で、赤血球のCO化処理も容易である。これらのことから、付加価値赤血球製剤として今後期待の大きい研究対象であると結論できる。

2. 赤血球モデルのNO, CO結合速度の解析

A. 研究目的

赤血球は35%濃度のHb溶液を細胞膜で覆った粒子(長径8 μm)である。生命の進化の過程で赤血球は細胞核を捨て酸素運搬の役割に特化し、両凹円板の形状をした赤血球の変形能と粒子表面積が酸素運搬には有効と考えられているが、物理化学的計測では実は分子状Hb溶液に比べ赤血球は酸素結合/放出速度が極めて遅く非効率的であることが報告されている。

本研究では、そのような非効率な赤血球構造の生理的意義を明示することを目的とし、モデル赤血球のガス状分子メディエータ(NO, CO)との結合反応の特徴を明らかにすることを目的としている。赤血球は裸のHb溶液に比べNOの結合が遅いことが知られているが、その理由として、赤血球膜近傍の非攪拌層によるガス分子の拡散律速と、赤血球内の高濃度Hbによる拡散律速が推測されている(Vaughn et al., 2000; Liu et al., 2002)。しかし測定法の限界もあり何れも推測の域を出ない。そこで本研究では、赤血球モデルとしてHb小胞体を用いた詳細解析を行うことを目的とした。赤血球モデルでは内包Hb濃度を自在に変えられる。赤血球モデルのNO, CO結合速度をストップフロー法により測定し、内水相高濃度Hbによる拡散律速の解明を試みた。

(文献)

Vaughn et al., J. Biol. Chem. 2000; 275: 2342-8

Liu et al., J. Biol. Chem. 2002; 277: 26194-9

B. 方法

赤血球は高い剪断応力によって溶血するので、赤血球モデルとして力学的強度のあるHb小胞体(HbV)を使用した。内水相Hb濃度の異なるHbVを4種類調製した([Hb] = 35, 20, 10, 1 g/dL; 平均粒径は何れも約270 nm, 酸素親和度: 13-14 mmHg)。結合速度の測定には、ユニソク社製ストップフロー測定装置(Model: RSP-1000型)を用いた。A液としてN₂ガスで脱

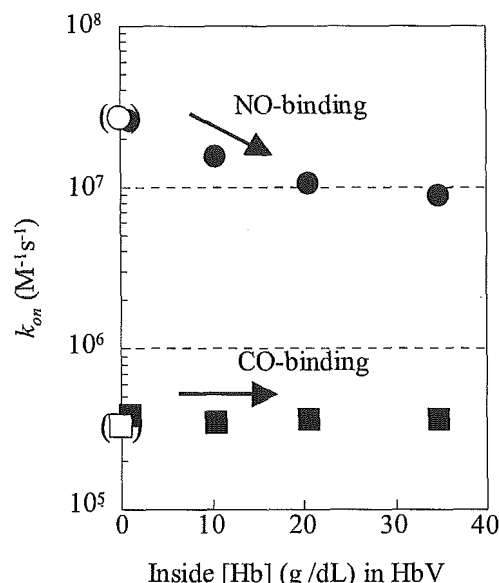


Figure 4. Influence of Hb concentration in HbV on NO (●) and CO (■) binding rate. NO (○) and CO (□) binding rate of Hb / PBS.

酸素化したHbV試料分散液([heme] = 3 μM , in PBS)と、B液として0.2004% NO/N₂混合ガス、或は14.14% CO/N₂混合ガスで飽和させたPBSを25°Cにて瞬間混合し、430 nm (deoxy HbのSoret帯 λ_{max})における吸光度の経時変化を観測し、擬一次反応と仮定して見かけのNO, CO結合速度定数: $k_{on}(\text{NO})$, $k_{on}(\text{CO})$ を算出した。Hb溶液についても同様に測定を行った。

C. D. 結果および考察

内水相Hb濃度が35 g/dLのとき、モデル赤血球のNO結合速度定数は、 $8.8 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であったのに対し、Hb溶液では、 $2.7 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、脂質膜で被覆することにより、NO結合速度が顕著に減少した。しかしこの値は、赤血球で別の方法により推定されている値($5.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Liu et al., 1998)に比較すると極めて速い値となる。次に内包Hb濃度を変化させた赤血球モデルのNO結合速度を測定したところ、内包Hbの濃度低下に伴い、NO結合速度定数は顕著に増大した。このことから、細胞内の高濃度・高粘度Hb溶液によるガス分子の拡散律速の存在と、またこれが支配的であることが初めて明らかになった。一方、CO結合速度はモデル赤血球とHbに殆ど違いは無く、また内包Hb濃度を変化させても大きな変化は見られなかった。COはNOに比べて結合速度が極めて遅いため、拡散律速の影響が小さいと考えられる。

E. 結論

人工赤血球は本物の赤血球よりも力学的強度があること、また条件設定が容易なので、従来赤血球では不可能であった様々な解析を可能とする。今回の実験により、赤血球のように高濃度Hb溶液を内包する構造が、HbのNO反応性を制御していることが明らかになってきた。しかし、今回の結果は希薄な均一分散溶液系のものであり、血管内では極めて濃厚な状態で流動していること、類洞血管のように血管外漏出する物質の粒子径に閾値があること、また赤血球の流動では血管壁近傍に血漿層が形成される事など、極めて複雑であるので、一概に結合速度のみから議論する事は出来ない。今後は、粒子径の異なる人工赤血球モデルの評価、またモデル血管内を流動させたときの反応性について検討し、本物の赤血球の様相を明らかにする予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) P. Cabrales, H. Sakai, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Intaglietta. Oxygen transport by low and normal P_{50} Hb-vesicles in extreme hemodilution. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H1885-H1892 (2005, April).
- 2) C. Contaldo, J. Plock, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leung, A. Banic, and D. Erni. New generation of hemoglobin-based oxygen carriers evaluated for oxygenation of critically ischemic hamster flap tissue. *Crit. Care Med.* 33:806-812 (2005, April).
- 3) H. Sakai, P. Cabrales, A.G. Tsai, M. Intaglietta, E. Tsuchida. "Oxygen Release from low and normal P_{50} Hb-vesicles from Transiently Occluded Arteriole in the Hamster Window Model." *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H2897-H2903 (2005, June).
- 4) J.A. Plock, C. Contaldo, H. Sakai, E. Tsuchida, M. Leung, A. Banic, M.D. Menger, D. Erni. "Is the Hb in Hb-vesicles infused for isovolemic hemodilution necessary to improve oxygenation in critically ischemic hamster skin?" *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289:H2624-H2631 (2005 Dec).
- 5) H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi. "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* (2006) in press.

6) H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. "One-year observation of Wistar rats after infusion of Hb-vesicles (Artificial oxygen carriers)." *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* (2006) in press.

(総説、著書など)

- 1) 酒井宏水、宗慶太郎、武岡真司、小林紘一、土田英俊. 人工赤血球. 「医療用マテリアルと機能膜」第5章、pp 107-118, (株)シーエムシー出版, 2005. 5.31
- 2) 酒井宏水、土田英俊、目でみるバイオ「微小血管内を均一に流れる人工赤血球とその運命」、バイオサイエンスインダストリー 63, 571-572. 2005 (9月).
- 3) 土田英俊、酒井宏水、小松晃之、小林紘一、酸素輸液(人工赤血球)の臨床応用. 先端医療シリーズ37「人工臓器・再生医療の最先端」第16章-4. pp. 279-286, 2005 寺田国際事務所 / 先端医療技術研究所 (11月)
- 4) H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, and E. Tsuchida, "Hemoglobin-Vesicles as a Molecular Assembly: Characteristics of Preparation Process and Performances as Artificial Oxygen Carriers." In "Blood Substitutes" (Ed. By Robert M. Winslow, Elsevier), Chapt. 44, pp. 514-522, 2006.
- 5) H. Sakai, E. Tsuchida. Performances of PEG-modified hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers in microcirculation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* (2006), in press.
- 6) A.G. Tsai, P. Cabrales, H. Sakai, and M. Intaglietta. "Blood Substitutes' Efficacy: Microvascular and Theological Determinants." In: *Microvascular Research: Biology and Pathology*, Vol. 2. (Ed: David Shepro), San Diego: Elsevier, 2006, pp. 1095-1103.

7) E. Tsuchida, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* (submitted).

2. 学会発表

- 1) 宗慶太郎、B. Goins, W.T. Phillips, 酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の血中半減期と代謝臓器への分布過程 / 2005.5.25-27 / パシフィコ横浜

- 2) 酒井宏水、宗慶太郎、武岡真司、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊／人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)大量投与後の細網内皮系における代謝過程／第54回高分子学会年次大会／2005.5.25-27／パシフィコ横浜
- 3) 酒井宏水、D. Erni, M. Intaglietta, 土田英俊／人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)による虚血領域酸素化の機序解明／第54回高分子学会年次大会／2005.5.25-27／パシフィコ横浜
- 4) 酒井宏水、堀之内宏久、武岡真司、小林紘一、土田英俊／人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)による血液希釈後の回復過程／第53回日本輸血学会総会／2005.5.26-28／東京ベイホテル東急
- 5) 酒井宏水、勢司泰久、佐藤夏枝、堀之内宏久、武岡真司、土田英俊、小林紘一／ヘモグロビン小胞体による50%出血ショック蘇生後の回復過程／第12回日本血液代替物学会年次大会／2005.6.6-7／東京 早稲田大学
- 6) 泉陽太郎、山本学、竹内健、渡辺真純、堀之内宏久、寺村裕治、酒井宏水、武岡真司、土田英俊、小林紘一／人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による固形腫瘍の酸素化の試み／第12回日本血液代替物学会年次大会／2005.6.6-7／東京 早稲田大学
- 7) 酒井宏水、勢司泰久、堀之内宏久、池田榮二、武岡真司、土田英俊、小林紘一／ヘモグロビン小胞体の単回投与1年後の血液生化学、組織病理学的検討／第12回日本血液代替物学会年次大会／2005.6.6-7／東京 早稲田大学
- 8) 阿部英樹、東寛、藤原満博、山口美樹、酒井宏水、武岡真司、土田英俊、池田久實／ヘモグロビン小胞体(HbV)がラット免疫系(脾臓細胞)に及ぼす影響／第12回日本血液代替物学会年次大会／2005.6.6-7／東京 早稲田大学
- 9) 山本学、堀之内宏久、渡辺真純、酒井宏水、武岡真司、勢司泰久、佐藤夏枝、須賀裕子、小林紘一、土田英俊／ビーグル犬50%脱血ショックモデルにおけるHb小胞体の蘇生効果と安全性評価／第12回日本血液代替物学会年次大会／2005.6.6-7／東京 早稲田大学
- 10) K. Kobayashi, H. Sakai, M. Yamazaki, M. Yamamoto, H. Horinouchi, S. Takeoka, R. Yozu, E. Tsuchida. / The efficacy of hemoglobin-vesicle, an artificial oxygen carrier, in hemorrhagic shock resuscitation, and cardiopulmonary bypass. / The 51st Annual Conference of American Society for Artificial Internal Organs (ASAIO). / 2005.6.9-11
- 11) H. Sakai, P. Cabrales, A.G. Tsai, S. Takeoka, D. Erni, M. Intaglietta, E. Tsuchida / Oxygen releasing from Hb-vesicles in ischemic microcirculation / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
- 12) H. Sakai, Y. Seishi, N. Satoh, H. Horinouchi, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Fourteen days observation after resuscitation from hemorrhagic shock using Hb-vesicles suspended in recombinant albumin in a rat model. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
- 13) J. Plock, C. Contaldo, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, D. Erni. / The role of hemoglobin encapsulated in liposome vesicles in the oxygenation of critically ischemic hamster flap tissue / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
- 14) H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, K. Sou, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Recovery after 40% exchange transfusion with Hb-vesicles suspended in recombinant albumin: physiological capacities for degradation of Hb-vesicles and hematopoiesis. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
- 15) T. Atoji, M. Aihara, H. Sakai, E. Tsuchida, S. Takeoka. / Prolongation of oxygen carrying ability of hemoglobin-vesicles by hydrogen peroxide elimination using methemoglobin and L-tyrosine / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
- 16) H. Sakai, Y. Seishi, K. Ohta, H. Horinouchi, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Histopathological and plasma biochemical analyses one year after bolus infusion of Hb-vesicles in Wistar rats. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
- 17) M. Yamamoto, K. Kobayashi, H. Horinouchi, H. Yamamoto, H. Sakai, S. Takeoka, Y. Suka, E. Tsuchida. / Safety and effectiveness of hemoglobin vesicles in 50% hemorrhage shock model in dog / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
- 18) H. Sakai, P. Cabrales, A.G. Tsai, S. Takeoka, D. Erni, M. Intaglietta, E. Tsuchida / Oxygen releasing from Hb-vesicles in ischemic microcirculation / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence,

RI/

19) K. Sou, B. Goins, W.T. Phillips, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida / Circulation kinetics and organ distribution of the hemoglobin-vesicles (HbV) / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/

20) K. Kobayashi, H. Horinouchi, Y. Izumi, M. Watanabe, H. Yamamoto, R. Yozu, H. Sakai, T. Komatsu, Y. Huang, A. Nakagawa, S. Takeoka, and E. Tsuchida. / Preclinical studies of Hb-vesicles and albumin-hemes. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/

21) Y. Izumi, M. Yamamoto, K. Takeuchi, M. Watanabe, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Systemic administration of hemoglobin vesicle augments radiation response in lewis lung carcinoma. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/

22) F. Ma, D. Wang, S. Handa, K. Ogami, K. Umeda, T. Hekei, H. Sakai, E. Tsuchida, T. Nakahata, and K. Tsuji / Generation of functional hemoglobin-synthesizing erythroid cells from human embryonic stem cells. / 34th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (ISEH) / 2005.7.30-8.2 / Univ. Glasgow, UK.

23) 酒井宏水、武岡真司、小林紘一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体) / 第34回

医用高分子シンポジウム / 2005. 8.1-2. / 東京、上智大学

24) H. Sakai, E. Tsuchida / Rheological property of hemoglobin-vesicles and the oxygen binding capacity / XIV International Material Research Congress / 2005. 8.21-25 / Cancun, Mexico

25) 酒井宏水、土田英俊 / 人工赤血球(Hb小胞体)のレオロジー特性と酸素放出挙動 / 第54回高分子討論会 / 2005.9.20-22 / 山形大学

26) 酒井宏水、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の代謝過程における脾臓微小循環の動的解析 / 第43回 日本人工臓器学会大会 / 2005.11.30 - 12.2 / 東京・日本都市センター

27) 小林紘一、堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊 / 人工赤血球製剤(ヘモグロビン小胞体)の臨床試験に向けて / 第43回 日本人工臓器学会大会 / 2005.11.30 - 12.2 / 東京・日本都市センター

28) 佐藤敬、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / ストップフロー法によるヘモグロビン小胞体のNO、CO結合反応の解析 / 日本化学会第86春季年会 / 2006.3.27 - 30 / 日本大学理工学部船橋キャンパス

H. 知的財産権の出願・登録状況

「一酸化炭素輸液剤」出願の予定(H18.2.11現在)

霊長類（コモンマーモセット）のショックモデルにおける α -NO 赤血球の効果

分担研究者 塚田 孝祐 慶應義塾大学医学部 医化学教室 助手

研究要旨：赤血球が酸素運搬や酸塩基平衡の調節に関与するだけでなく、積極的に微小循環血流維持作用を発揮している可能性が示唆されてきている。具体的には赤血球が血管内の酸素濃度を感知して NO などの低分子のガスや有機酸を活発に放出・回収を行い、その一部が血管拡張や血小板活性化制御に関与する可能性が示されつつある。本分担研究は、血管作動物質のシンクリザーバーとしての赤血球の分子機構解明を試みることにより、高い酸素運搬能と微小循環血流保持機能を付与した新しい赤血球製剤開発に必要な不可欠な理論基盤を構築することを目的とし、赤血球の微小循環における酸素運搬能と血流改善効果を出血性ショックモデルを用いて解析を行ってきた。ヘモグロビン α 鎖に NO を結合させた α -NO 赤血球は循環内半減期が約 1 時間であり、ショックに対する酸素供給、血流改善が十分であることが昨年度までの研究で明らかになったが、今年度は霊長類のコモンマーモセットを用いて輸血実験を行い、動物種の差異による評価を行った。その結果、 α -NO 赤血球の輸血効果は対照として用いた自己血液群と同等の効果を有することを示すに至った。

A. 研究目的

近年、赤血球が血管内の酸素濃度を感知して一酸化窒素(NO)などの低分子のガスや有機酸を活発に放出・回収を行い、その一部が血管拡張や血小板活性化制御に関与している可能性が示されつつある。つまり、これまでの精製ヘモグロビン修飾体による人工酸素運搬体では赤血球が本来保持しているこのような付加価値機能を完全に補完することはできないことを意味している。

本研究で作製されたヘモグロビン α 鎖に特異的に NO 分子を結合させた赤血球（以下 α -NO 赤血球）は、血管作動物質のシンクリザーバーとして機能することが明らかになりつつある。また、 α -NO-赤血球は、酸素解離曲線を右にシフトさせることがこれまでの研究から明らかになっており、それは組織への酸素輸送の観点から、低酸素領域に必要な十分な酸素を供

給することが可能であることを示唆している。

以上の仮説を証明するために、本分担研究では小型霊長類であるコモンマーモセットを用いて 40% 出血性ショックを惹起し、これまで確立してきたヘモグロビンアロステリーの制御法を用いて作製した α -NO 赤血球により蘇生を試み、その有効性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

B-1 実験に用いた動物と処置法

本実験は（財）実験動物中央研究所動物資源開発部 霊長類共同実験施設にて行われ、事前に同施設において動物実験委員会の承認を得て行われた。また慶應義塾大学にて行われた実験に関しては慶應義塾大学動物実験委員会の承認を受け (No.1756)、実験指針に基づき実施された。

実験に用いたコモンマーモセットに導入麻酔薬として硫酸アトロピン、ミダゾラム（筋肉内投与）および非動化薬として塩酸ケタミン（筋肉内投与）を用いた。気管内挿管を施し、Isoflurane (1.2~1.4%) で生理状態を維持した。酸素ガスをレスピレータに接続し、ストローク数 26/min, 一回換気量 6 ml に設定した。術中は適切な麻酔薬, 方法を選択し, 最適な麻酔環境下で処置を行った。術後は速やかに体調等を回復させるよう感染防止および疼痛管理を実施し（処置部位の消毒, 抗生剤, 鎮痛・消炎解熱剤の投与）, 栄養状態にも留意した。安楽死の方法は塩酸ケタミン麻酔下での放血安楽死とした。

コモンマーモセットを無作為に 3 群に分け, それぞれ α -NO 赤血球 (n=3), 洗浄自己赤血球 (n=3), 生理食塩水群 (n=3) とした。右大腿部に A ライン (脱血用) および V ライン (輸血用) を確保し, また左大腿部に A ライン (血圧測定用) を確保した。30 分間の血圧安定を確認し, 0.5ml/min で脱血を開始した。血圧が 40mmHg に達するか, 或いは脱血量が全血液量 40% に達した時点で脱血を停止し, 30 分間維持した。 α -NO 赤血球, 洗浄自己赤血球, 生理食塩水を 1.0ml/min で脱血量と同量輸液し, 完了後 1 時間血圧を観察した。実験終了後, 採血を行い血液ガスを分析した。実験後のコモンマーモセットは縫合処置を行い, 蘇生後経過観察とした。

B-2 α -NO 赤血球作製

生理食塩水群から脱血した血液を buffer にて 3 回洗浄して採取した赤血球を実験に用いた。赤血球をヘマトクリット 10% に調整し, ガスタイトバイアルにて Ar パージ後, NO ドナーである GSNO を添加し, 1 時間 4°C にて反応させた。輸血には 3 回 buffer で洗浄して用いた。

C. 研究結果および考察

C-1 出血ショック・輸血における血圧の変化

今回用いたコモンマーモセットの体重は生理食塩水群が 295 ± 7 g, 自己血液群は 283 ± 32 g, α -NO 赤血球群では 310 ± 9 g であった。また, ショック状態に至る脱血量はコモンマーモセットの体重より推定し, 全循環血液量に対して生理食塩水群: 36.0 ± 4.8 %, 洗浄自己赤血球群: 35.7 ± 1.2 %, α -NO 赤血球群: 27.5 ± 5.0 % であった。

図 1 に生理食塩水群, 自己血液群, α -NO 赤血球投与群の輸血前後の血圧の変化を示した。Isoflurane による吸入麻酔を開始してから 30 分後に血圧の安定を確認し, ショック前血圧値

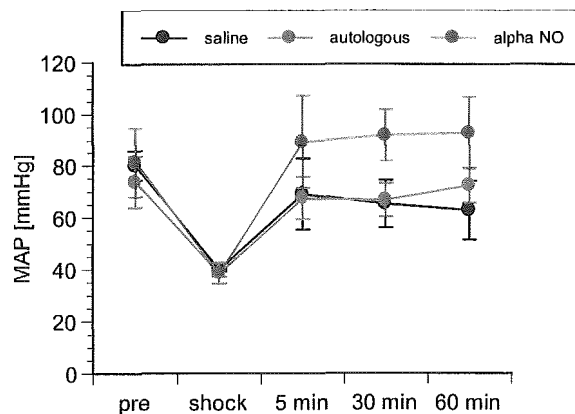


図 1 各輸液投与前後の血圧変化

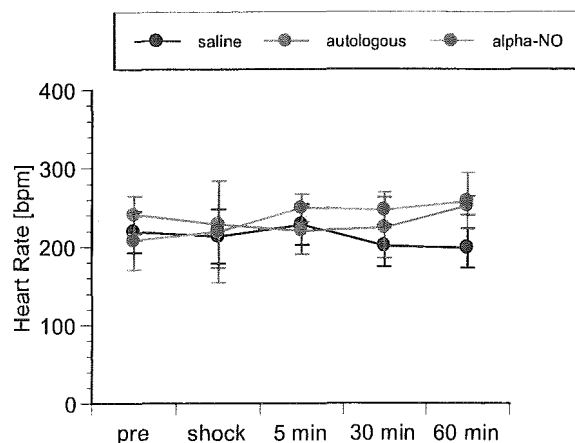


図 2 各輸液投与前後の心拍数変化

(pre)とした。また脱血直後の血圧をショック時における値とし、輸血5分後、30分後、60分後の血圧を記録した。

脱血前およびショック時の血圧は各群ともに同様の変化を示しており、すなわち各群の間で同様の麻酔深度、生理状態が維持されていると言える。輸血後の血圧変化は生理食塩水群、自己血液群は同様の変化を示した。一方、 α -NO 赤血球輸血群は他の群に比べて血圧の回復が良好であった。これは脱血量が他の群に比べて少なかったことも一因と考えられるが、前述のようにショック時の血圧は全ての群において40mmHgまで低下しており、 α -NO 赤血球の輸血効果によるものと考えていい。前年度までのラットを用いた実験においても、血圧の回復は生理食塩水や自己血液と同等の回復を示すことが分かっており、霊長類においても良好な血圧の回復を呈することが示された。また、齧歯類の実験では輸血直後に血圧の一時的な低下が認められたが、マーモセットではその現象は認められなかった。これは α -NO 赤血球の作製法の違いによるものと懸念されたが、今回の作製法でもヘモグロビン α 鎖に特異的にNOが結合されていることは電子スピン共鳴法より確認済みであり、動物種による違いと思われた。一方、図2に示したように実験中の心拍数は各群において著明な変化は認められなかった。

C-2 血圧ガス分析による評価

各輸液を輸血して1時間後に採血を行い、血漿pH、Lactate値を分析した。図3に示したように、輸血後pHは生理食塩水群では 7.43 ± 0.12 、自己血液群では 7.42 ± 0.07 、 α -NO 赤血球では 7.41 ± 0.01 であり、全ての群において正常値を示した。また図4に示したように、血漿Lactate値は生理食塩水群が 0.70 ± 0.43 mM、自己血液群が 0.57 ± 0.05 mM、 α -NO 赤血球では

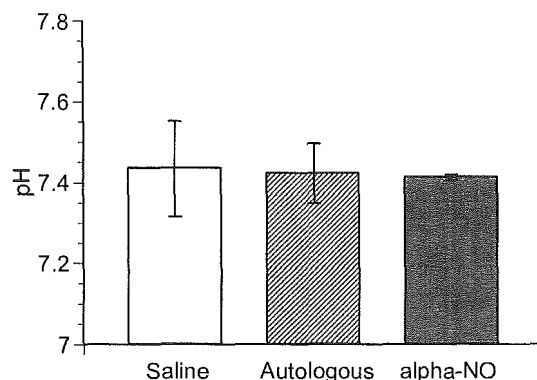


図3 蘇生1時間後の血漿pH値

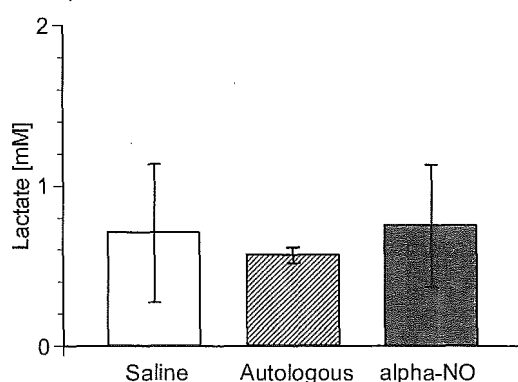


図4 蘇生1時間後の血漿Lactate値

0.75 ± 0.38 mM であり、自己血液群と同等のショックからの回復を示すものであった。

D. 結論

ヘモグロビン α 鎖に特異的にNOガス分子を修飾して得られる赤血球機能を救急医療用途に適したマテリアルとする可能性について霊長類のコモンマーモセットを用いて検討した結果、以下の成果を得た。

- (1) 出血性ショックに対して α -NO 赤血球を輸血した結果、ショック前の血圧まで十分回復することが明らかになった。また対照として用いた洗浄自己赤血球群より増大する傾向が認められた。これまでの齧歯類による実験結果においても α -NO 赤血球による輸血は良好な血圧の回復を示したが、霊長

類においてもそれが確認された。

- (2) 輸血後の血液分析から、血漿 pH、乳酸値は正常範囲まで回復することが明らかになった。これは α -NO 赤血球が組織における酸素の需要に対して十分供給されていることを示す結果である。これまでの齧歯類の実験から、 α -NO 赤血球は代謝性アシドーシスを改善する効果を有することを示したが、今回のコモンマーモセットの実験からはその優位性を示すには至らなかった。これは動物種によるショックに対する抵抗性の違いによるものと思われた。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

F-1 論文発表

- 1) Suganuma K.*, Tsukada K.*, Kashiba M., Tsuneshige A., Goda N., Kitajima M., Yonetani T., Suematsu M.: Erythrocytes with T-state-stabilized hemoglobin as a therapeutic tool for post-ischemic liver dysfunction, *Antioxidants & Redox Signaling*, in press. (* equally contributed author)
- 2) Suematsu M., Tsukada K., Tajima T., Yamamoto T., Ochiai D., Watanabe H., Yoshimura Y., Goda N.: Carbon monoxide as a guardian against hepatobiliary dysfunction, *Alcoholism, clinical and experimental research*, 29 (11), 134S-139S.. 2005.
- 3) 塚田孝祐：低酸素のバイオイメージング，別冊医学のあゆみ「レドックス ～ストレス防御の医学～」，pp. 183-7, 2005.

F-2 学会発表

- 1) Tsukada K., Suganuma K., Yonetani T., Suematsu M.: T-state stabilization of hemoglobin

allostery: A potential therapeutic stratagem for post-ischemic organ microvascular damages, 6th Asian Congress for Microcirculation, 2005-2, (Tokyo).

- 2) Tsukada K., Tajima T., Goda N., Soga T., Johnson R., Suematsu M.: Hepatocyte-specific gene targeting of hypoxia-inducible factor-1 blunts hepatic regeneration and remodeling of oxygen metabolism after partial hepatectomy, 4th HO conference, 2005-10, (Boston).
- 3) 塚田孝祐，末松 誠：Direct Measurement of Oxygen Consumption in Hepatic lobules with Laser Assisted Photometry, 第78回日本生化学会大会，2005-10（神戸）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

ヘモグロビンアロステリーを利用した付加価値赤血球の創剤と 救急医療への応用に関する研究

分担研究者 芹田良平 慶應義塾大学医学部 麻酔学教室 助手

研究要旨：高濃度の CO₂ の暴露によりアロステリー変化を受けたヘモグロビン血（CO₂-hemoglobin 血）の投与が、出血性ショック・再灌流後の心機能障害に与える影響をラット出血性ショック・再灌流モデルで検討した。ラットを用い、重度出血性ショックモデル（体重 100g 当たり 3.1 ml の脱血）を作成し、1 時間後、無作為に 2 群に分け、脱血相当量の CO₂-hemoglobin 血（CO₂-Hb group）または洗浄赤血球血（Control group）を投与した。心機能の測定は、1 時間ごとに 3 時間行った。虚血・再灌流後の心拍出量は CO₂-Hb group において、Control group に比較し有意に高い値を示した（ $P < 0.01$ ）。24 時間後の死亡率は、両群とも 0 % で差はなかった。また、脱血前、脱血 60 分後、24 時間後の乳酸値は、有意な差を認めなかった。出血性ショック・再灌流モデルに対する CO₂-hemoglobin 血投与は、再灌後の心拍出量を保つことが示された。

A. 研究目的

出血性ショック・再灌流後に見られる多臓器障害は、サイトカイン、一酸化窒素 (NO)、Oxygen free radical 等が関与し、さらにミトコンドリアの傷害や酸素需給バランスの障害により引き起こされる (Shock 1999 12(1):1, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000 278(3):H942)。また、臓器不全の一つである心機能の低下は、更なる酸素需給バランスの障害を引き起こし、悪化させる可能性がある (Lancet 2004 12;363(9425):1988)。

一方、高濃度の CO₂ の暴露によりアロステ

リー変化を受けたヘモグロビン血（CO₂-hemoglobin 血）は構造的変化から酸素放出能の増加により組織の酸素摂取率を増加させ、酸素需給バランスを改善するだけでなく、ATP 放出によるレオロジー変化により末梢循環をも改善し、出血性ショック・再灌流後の心拍出量維持に効果的である可能性がある。

そこで、CO₂-hemoglobin 血の投与が、出血性ショック・再灌流後の心機能障害に与える影響をラット出血性ショック・再灌流モデルで検討した。

B. 研究方法

I. CO₂-hemoglobin 血および洗浄赤血球血の作成

ドナーラットの上行大動脈にカニューレーションを行い、血液を採取した。その後、洗浄赤血球を作成した。人工肺（ラット人工肺 泉工医科 東京）を用いて、4 倍希釈したラット洗浄赤血球を 60 分間 100%CO₂ により脱酸素化、CO₂-hemoglobin 血（CO₂-Hb 血）を作成した。その後、CO₂-Hb 血は、CO₂ により脱酸素化した生理食塩水で再び洗浄し、ヘマトクリット 30%の洗浄血とした。

II. 生体内での心機能評価

ラット 12 匹（Wister 系ラット 雄 360～380 g）を、pentobarbital 麻酔下に内頸動静脈にカニューレーションし、静脈カテーテルより生理的食塩水を 10ml/kg/hr で投与を開始した。続いて、気管切開し、人工呼吸管理を行った。内頸動脈カテーテルより、圧センサー付コンダクタンスカテーテル（SPR-838 MILLAR USA）を挿入した。圧センサー付コンダクタンスカテーテルは、容積信号ケーブル（CEC-10 MILLAR USA）を通して、心室圧-容積測定装置（ARIA-1 MILLAR USA）に接続し、コンピューターを用いて解析した。

その後、体重 100g 当たり 3.1 ml の脱血（Shock 2004 22(2):151）を行い、重度出血性ショックモデルを作成した。1 時間後、無作為に 2 群に分け、脱血相当量の CO₂-hemoglobin 血（CO₂-Hb group）または洗浄赤血球血（Control group）を内頸静脈カテーテルから 10 分間かけて投与した。その後、心機能の測定は、1 時間ごとに 3 時間まで行った。

III. 死亡率の検討

ラット 20 匹（Wister 系ラット 雄 360～380 g）を、pentobarbital 麻酔下に内頸動静脈にカニューレーションし、静脈カテーテルより生理的食塩水を 10ml/kg/hr で投与を開始した。その後、体重 100g 当たり 3.1 ml の脱血（Shock 2004 22(2):151）を行い、重度出血性ショックモデルを作成した。1 時間後、無作為に 2 群に分け、脱血相当量の CO₂-hemoglobin 血（CO₂-Hb group）または洗浄赤血球血（Control group）を内頸静脈カテーテルから投与した。輸血後 24 時間観察し、死亡率を観察した。

血液分析

また、脱血前、脱血 1 時間後、24 時間後に採血し、血液ガス分析装置（ABL 700 RADIOMETER COPENHAGEN）で血中の乳酸値を測定した。

IV. 統計学的解析

経時的変化を測定した値には、反復測定分散分析を用い、死亡率の検定には、Kaplan-Meier analysis と log-rank test を用いた。P < 0.05 のとき、有意差ありとした。

（倫理面への配慮）

生体内での心機能評価において、ラットは、実験日まで十分な餌と水を与えて飼育した。また、実験に際しては、全例麻酔下に処置を行った。手術操作は、可能な限り無菌的に行った。

死亡率の検討において、ラットは十分な餌と水に加え、低濃度の pentobarbital 投与によるセデーション下に観察した。

C. 研究結果

生体内での心機能評価

心拍出量の経時的な変化を図1に示す。再灌流後の心拍出量は、Control group に比し CO₂-Hb group で有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。

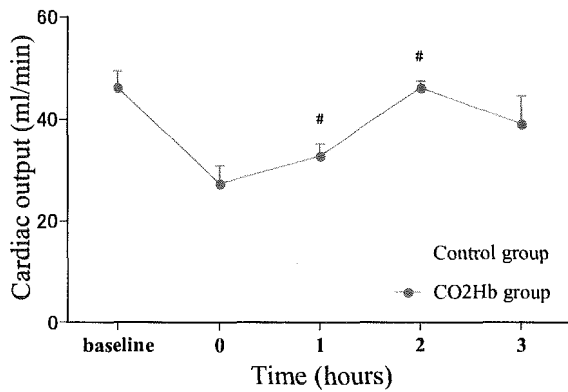


図1.心拍出量の経時変化

横軸の0は、輸血直前の値。# : $p < 0.05$ vs. Control at the time point

心収縮力の指標である Max Elastance(E_{max})は Control group に比し CO₂-Hb group で高く保つものの、有意な差は得られなかった ($p = 0.08$) (図2)。

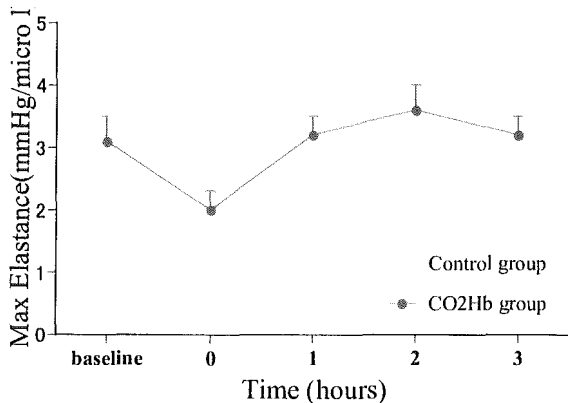


図2. Max Elastance の経時変化

横軸の0は、輸血直前の値。

死亡率の検討

24 時間後の死亡率は、両群とも 0% で差はなかった。また、脱血前、脱血 1 時間後、24 時間後の乳酸値は、有意な差を認めなかった ($p = 0.9$) (図3)。

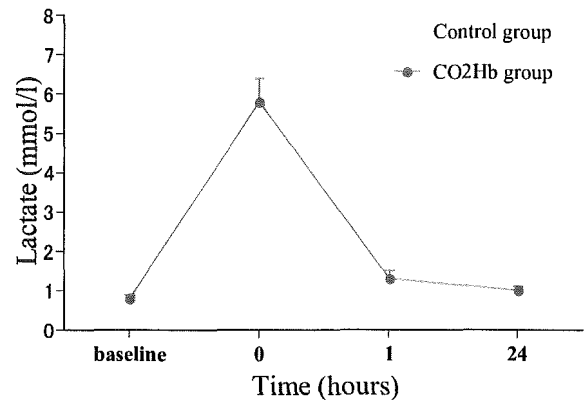


図3.乳酸値の経時変化

横軸の0は、輸血直前の値。

D. 考察

この研究により、CO₂-hemoglobin 血の出血性ショックに対する投与では、再灌流後の心拍出量を有意に高く維持することが示され、再灌流後の心収縮力を高く維持する可能性が示唆された。

また、CO₂-hemoglobin 血の deteriorating factor を検討するために行った死亡率の検討では、洗浄赤血球投与群同様に 24 時間の死亡率は 0% であり、他の重要臓器に与える悪影響は少ないと考えられる。抹消循環の指標である乳酸値の変化は、両群とも同様の変化を示し、CO₂-hemoglobin 血輸血による改善は今回の研究では示せなかった。

また、 α -NO ヘモグロビン血投与とは異なり、著しい血尿は観察されなかった。これは、

人工肺の使用により脱酸素化に必要なバブリングにより赤血球の膜表面が傷害されることを少なく出来た結果と推測された。

高炭酸ガスは、ヘモグロビンのアロステリック変化を起こすだけでなく、TNF- α 等のサイトカインの産生を抑制することが報告されている (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005 289(1):L96-L103)。このことも、虚血再灌流障害等の高サイトカイン血症が予測される病態においては優れている可能性がある。

E. 結論

出血性ショック・再灌流モデルに対するCO₂-hemoglobin 血投与は、再灌後の心拍出量を保つことが示され、心収縮力も維持する可能性が示唆された。

また、CO₂-hemoglobin 血投与に伴う致命的なdeteriorating factor はないと考えられた。

今後の課題として、投与した CO₂-hemoglobin 血がサイトカインの放出を抑制し、大量輸血後の臓器障害を軽減するかの検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者名	論文タイトル名	書籍名	出版社名	ページ	出版年
末松 誠	Heme oxygenase-CO 系による細胞機能制御機構	別冊医学のあゆみ「レドックス ～ストレス防御の医学～」	医歯薬出版（株）	50-55	2005
塚田孝祐	低酸素のバイオイメーシング	別冊医学のあゆみ「レドックス ～ストレス防御の医学～」	医歯薬出版（株）	183-187	2005
酒井宏水、宗慶太郎、武岡真司、小林紘一、土田英俊	医療用マテリアルと機能膜	人工赤血球	(株)シーエムシー出版	107-118	2005
酒井宏水、土田英俊	微小血管内を均一に流れる人工赤血球とその運命	目でみるバイオ	バイオサイエンストインダストリー	571-572	2005
土田英俊、酒井宏水、小松晃之、小林紘一	酸素輸液(人工赤血球)の臨床応用	先端医療シリーズ 37「人工臓器・再生医療の最先端」	寺田国際事務所 / 先端医療技術研究所	279-286	2005
H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, and E. Tsuchida	Hemoglobin-Vesicles as a Molecular Assembly: Characteristics of Preparation Process and Performances as Artificial Oxygen Carriers	Blood Substitutes	Elsevier	514-522	2006
A.G. Tsai, P. Cabrales, H. Sakai, and M. Intaglietta.	Blood Substitutes' Efficacy: Microvascular and Theological Determinants.	Microvascular Research: Biology and Pathology	Elsevier	1095-1103	2006

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Suganuma, K., Tsukada, K., Tsuneshige, A., Kashiba, M., Yonetani, T., Suematsu, M.	T-state stabilization of hemoglobin allostery by nitric oxide: a protection against post-ischemic hepatobiliary dysfunction	Antioxid. Redox Signal.		in press	2005

Suematsu M., Tsukada K., Tajima T., Yamamoto T., Ochiai D., Watanabe H., Yoshimura Y., Goda N.	Carbon monoxide as a guardian against hepatobiliary dysfunction	Alcoholism, clinical and experimental research	29 (11)	134S-139S	2005
Fujii, K., Sakuragawa, T., Kashiba, M., Sugiura, Y., Maruyama, K., Goda, N., Nimura, Y., Suematsu, M.	Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver	Antioxid Redox Signal.	7(5-6)	788-794	2005
Sugiura, Y., Kashiba, M., Hoshikawa, K., Sasaki, R., Saito, K., Kimura, H., Maruyama, K., Goda, N., Suematsu, M.	Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes.	Antioxid. Redox Signal.	7(5-6)	781-787	2005
Tian, J., Bryk, R., Itoh, M., Suematsu, M., Nathan, C.	Variant tricarboxylic acid cycle in Mycobacterium tuberculosis: Identification of a-ketoglutarate decarboxylase.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	102	10670-10675	2005
Ishikawa, M., Kajimura, M., Adachi, T., Maruyama K., Makino, N., Goda, N. Yamaguchi T., Sekizuka E., Suematsu M.	Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against nitric oxide-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation	Circ Res		in press	2005
Katagiri, H., Ito, Y., Ishii, K., Hayashi, I., Suematsu, M., Yamashita, S., Murata, T., Narumiya, S., Kakita, A., Majima, M.	Involvement of thromboxane derived from cyclooxygenase-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice.	Hepatology	39	139-150	2004
Tomita, K., Azuma, T., Kitamura, N., Nishida, J., Inokuchi, S., Nishimura, T., Suematsu, M., Ishii, H.	Pioglitazone prevents alcohol-induced fatty liver in rats through upregulation of c-Met	Gastroenterology	126	873-885	2004
Kudo, A., Kashiwagi, S., Yoshimura, Y., Uchida, K., Arai, S., Suematsu, M.	Kupffer cells alter organic anion transport via multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver	Hepatology	39	1099-1109	2004
P. Cabrales, H. Sakai, A. G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Intaglietta.	Oxygen transport by low and normal P ₅₀ Hb-vesicles in extreme hemodilution.	Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol	288	H1885-H1892	2005

C. Contaldo, J. Plock, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leuing, A. Banic, and D. Erni.	New generation of hemoglobin-based oxygen carriers evaluated for oxygenation of critically ischemic hamster flap tissue	Crit. Care Med.	33	806-812	2005
H. Sakai, P. Cabrales, A.G. Tsai, M. Intaglietta, E. Tsuchida.	Oxygen Release from low and normal P ₅₀ Hb-vesicles from Transiently Occluded Arteriole in the Hamster Window Model.	Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.	288	H2897-H2903	2005
J.A. Plock, C. Contaldo, H. Sakai, E. Tsuchida, M. Leuning, A. Banic, M.D. Menger, D. Erni.	Is the Hb in Hb-vesicles infused for isovolemic hemodilution necessary to improve oxygenation in critically ischemic hamster skin?	Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol	289	H2624-H2631	2005
H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi.	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	2006
H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi.	One-year observation of Wistar rats after infusion of Hb-vesicles (Artificial oxygen carriers)."	Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.		in press	2006

IV 研究成果の刊行物・別刷

**Erythrocytes with T-state-stabilized hemoglobin as a therapeutic tool for
post-ischemic liver dysfunction**

Kazuhiro Suganuma, Kosuke Tsukada, Misato Kashiba, Antonio Tsuneshige,
Toshiharu Furukawa, Toshiro Kubota, Nobuhito Goda, Masaki Kitajima,
Takashi Yonetani, Makoto Suematsu

Department of Biochemistry and Integrative Medical Biology and Department of
Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan
Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine,
University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

KS and KT equally contributed to this work as the first author.

Running Title: T-state stabilized hemoglobin and organ dysfunction

Address for Correspondence and Reprints:

Makoto Suematsu, MD, PhD

Professor and Chair

Department of Biochemistry and Integrative Medical Biology

School of Medicine, Keio University

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku

Tokyo 160-8582, Japan

Phone: +81-3-5363-3753

Fax: +81-3-3358-8138

E-mail: msuem@sc.itc.keio.ac.jp