

なされていなかった。昨年度作成した動物モデルにおいては軽度な炎症のモデルとしての評価が可能であった。本年度は高度な炎症モデルにおけるHbVの有効性と効果について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象動物と大腸炎モデル

野生型C57BL/6マウス、雌性、8~10週齢を使用する。マウスに2.0%dextran sulfate sodium (DSS)を10日間経口投与すると下痢や血便を生じ、急性大腸炎を発症する。

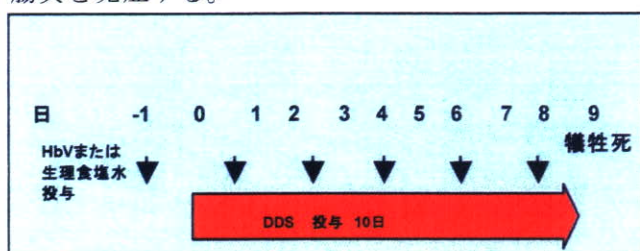


Fig. 1. Schema of experimental protocol

2. HbV投与方法

HbVは尾静脈から1回あたり20ml/kg注射する。DSSの投与開始日1日前より1日おきに6回HbVを投与する。比較対照として生理食塩水投与群(1回あたり20ml/kg)を作成する。

3. 主な観察・検査項目

HbVの投与終了後、DSS投与開始後10日目に加療のエーテルによりマウスを犠牲死させる。それぞれ下記の項目を検討し、生理食塩水投与群(1回あたり20ml/kg)と比較する。

1) 体重、大腸炎活動性指数 Disease Activity Index (DAI); 体重減少や下痢、血便の程度を評価する。体重減少は5段階、便の性状と血便は3段階でスコアをつけ、合計する。

2) 大腸浮腫; 大腸浮腫の指標として切除した大腸の腸管重量と腸管の長さの比(腸管重量/腸管

長)を測定する。

3) 血清アミロイドA (SAA); マウスの炎症マーカーとして有用である。

C. 結果および考察

1. 体重変化への影響 (Fig. 2)

今回のモデルにおいてもDSS投与によるマウス急性大腸炎モデルにおいて、HbV投与群ではコントロール群と比較して体重減少が抑制される傾向にあった。

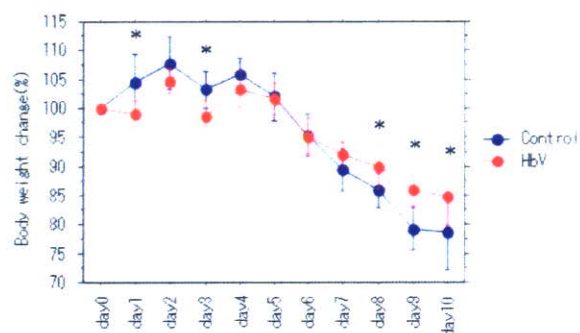


Fig. 2. Effects of Hb vesicle (HbV) on body weight change in a mouse DSS-induced colitis model.

体重の減少は生食投与群、HbV投与群ともにDSS投与後3日目から始まり、実験気管を通して体重の減少を認めた。Day3,Day8,9,10に有意差を認めた。

2. 大腸炎活動性指数 (DAI)への影響 (Fig. 3)

体重減少に加えや下痢、血便の程度を評価する大腸炎活動性指数も、HbV与群ではコントロール群と比較して改善される傾向にあった。有意差は認めなかったものの、5日目以降、指数はHbV投与群ではコントロール群よりも低い値であった。

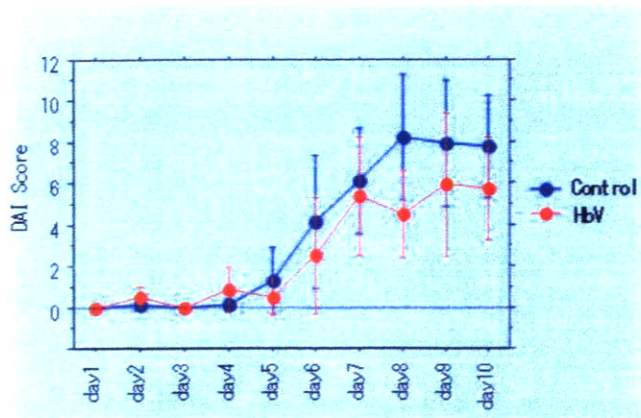


Fig. 3. Effects of Hb vesicle (HbV) on the activity of inflammatory disease in a mouse dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model.

3. 大腸浮腫 (Fig. 4)

大腸浮腫の程度を腸管重量/腸管長比で検討したところ、HbV群で浮腫の程度が軽減されており、DSSによる腸炎の程度を減少させることが可能であったと考えられた。

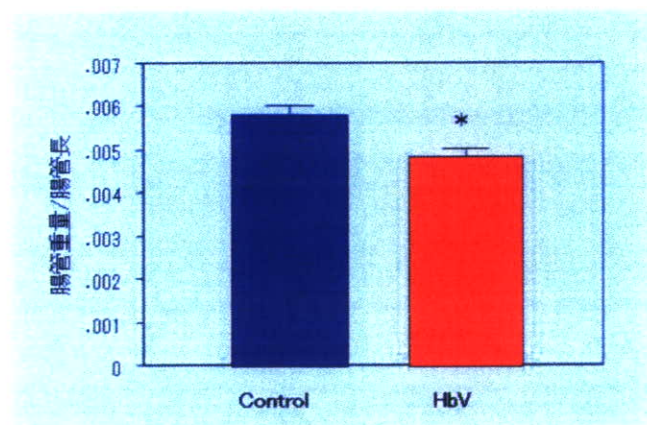


Fig. 4. Effects of Hb vesicle (HbV) on the weight / length ratio of inflammatory colon in a mouse DSS-induced colitis model.

D. 結論

昨年度HbVの投与が炎症成長疾患の炎症性変化を軽減させる可能性があることが示唆された。しかし、病変の程度が軽度であったために大將軍との比較が十分にできなかった。本年度は腸炎の程度を高度としたモデルを用い、HbV投与による全身状態と腸炎の程度が改善するか否かについて検討した。

結果は、DSS投与によるマウス急性大腸炎モデル

において、HbV投与群ではコントロール群と比較して大腸炎活動性指数 DAIと体重減少が改善される傾向にあった。病理組織学評価と血清アミロイドAによる評価では改善を認めなかった。

生理食塩水またはHbVを隔日に経静脈投与することによって飲水量が減り、DSSの摂取量が少なくなり、そのため十分な大腸炎が起こらず、HbVの投与効果が十分得られなかった可能性がある。DSS投与の期間や濃度などを変更して更なる検討を継続する必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. H. Komatsu, T. Furuya, N. Sato, K. Ohta, A. Matsuura, T. Ohmura, S. Takagi, M. Matsuura, M. Yamashita, M. Itoda, J. Itoh, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Effect of hemoglobin vesicle, a cellular-type artificial oxygen carrier, on middle cerebral artery occlusion- and arachidonic acid-induced stroke models in rats. *Neurosci. Lett.* 421, 121-125 (2007).
2. 高折益彦、堀之内宏久、小林統一. 救急医療の現場での輸血医療の実態と人工酸素運搬体への期待. *救急医学* 31, 981-986 (2007).
3. 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.* 35, 81-91 (2007).
4. T. Komatsu, Y. Huang, S. Wakamoto, H. Abe, M. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Influence of O₂-carrying plasma hemoprotein "albumin- heme" on complement system and platelet activation in vitro and physiological responses to exchange transfusion. *J. Biomed. Mater. Res.* 81A, 821-826 (2007).

5. M. Yamamoto, Y. Izumi, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, M. Kohno, M. Watanabe, T. Adachi, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Systemic administration of hemoglobin vesicles elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J. Surg. Res.* (in press).

6. H. Kuroda, M. Kawamura, T. Hato, K. Kamiya, M. Kawakubo, Y. Izumi, M. Watanabe, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone after chemotherapy with vinorelbine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (in press)

7. H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Histopathological changes of rat brain after direct injection of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. *J. Biomed. Materials Res. Part A* (submitted).

8. H. Sakai, Y. Seishi, Y. Obata, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Fluid Resuscitation with Artificial Oxygen Carriers in Hemorrhaged Rats: Profiles of Hb-vesicles Degradation and Hematopoiesis for 14 days. *Shock*. (submitted)

(総説、著書など)

1. 酒井宏水、堀之内宏久、山本学、池田 栄二、武岡真司、高折益彦、土田英俊、小林絃一 / ヘモグロビン小胞体(HbV)-リコンビナントアルブミン分散溶液による40%交換輸血:ラット脾臓内HbV代謝と造血に関する2週間の観察 (論文記事、Secondary Publication). *日本輸血細胞治療学会誌* 53, 47-55 (2007)

2. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: Present situation and future vision. *J. Intern. Med.* 263, 4-15 (2008).

3. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers

(Review paper). *Artif. Organs* (submitted)

2. 学会発表

1. 宮川賀仁、酒井宏水、佐藤 敦、堀之内宏久、武岡真司、高折益彦、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)と各種代用血漿剤の併用によるラット血液交換試験 / 第56回高分子学会年次大会 / 2007.5.29-31 / 京都国際会議場

2. 酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)による50%出血性ショック蘇生後の回復過程 / 第56回高分子学会年次大会 / 2007.5.29-31 / 京都国際会議場

3. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Fluid resuscitation with Hemoglobin-vesicles (Artificial Red Cells) in hemorrhaged rats and profiles of recovery for 14 days. / 53rd Annual Conference of ASAIO / 2007. 6.7-9 / Chicago, USA.

4. 酒井宏水、佐藤敦、宮川賀仁、武岡真司、堀之内宏久、高折益彦、小林絃一、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体と各種代用血漿剤の併用に関する検討 / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス

5. 須崎裕典、酒井宏水、小林直樹、池田達彦、堀之内宏久、小林絃一、武田朴、戸川達男、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体に対応できる多波長パルス分光法を用いたパルスオキシメータ / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス

6. 池田達彦、堀之内宏久、井澤菜緒子、河野光智、泉陽太郎、渡辺真純、川村雅文、宗慶太郎、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存の評価 / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス

7. 河野光智、堀之内宏久、泉陽太郎、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / ヘモグロビン小胞体の炎症性腸疾患治療への応用 / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学

8. H. Sakai, A. Sato, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Hemoglobin vesicles as artificial oxygen carriers: Interactions with ligand molecules in the production process and in blood circulation. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
9. H. Horinouchi, N. Aikawa, M. Kohno, Y. Izumi, H. Sakai, K. Sou, T. Komatsu, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Change of cytokine production in intra-abdominal hemorrhage model. -Effect of hemoglobin-vesicles. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
10. T. Ikeda, H. Horinouchi, M. Kohno, Y. Izumi, M. Watanabe, H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Resuscitation effect and long term effect of Hb vesicles on organ function in beagle dog. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
11. M. Kohno, H. Horinouchi, Y. Izumi, T. Ikeda, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Application of hemoglobin vesicles to anemia due to inflammatory bowel disease in a mouse model. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
12. Y. Izumi, T. Yamada, E.N. Ogawa, H. Morisaki, H. Sakai, H. Horinouchi, J. Takeda, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Administration of hemoglobin vesicle under mechanical ventilation does not affect lung function. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
13. H. Suzaki, H. Sakai, N. Kobayashi, T. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, S. Takeda, T. Togawa, E. Tsuchida. / Multiwavelength pulse spectrophotometry applicable for hemoglobin-vesicles. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
14. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Fluid resuscitation with Hb-vesicles in hemorrhaged rats and profiles of recovery for 14 days. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
15. 富田裕、鳥海春樹、長田高志、富田稔、畝川美悠紀、酒井宏水、土田英俊、堀之内宏之、小林統一、鈴木則宏／マウス脳梗塞モデルへの人工赤血球投与の試み／第19回 日本脳循環代謝学会総会／2007. 10.25-26／盛岡
16. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Hb-vesicles as artificial oxygen carriers: Interactions with ligand molecules in the production process and in blood circulation. / 2007 Joint Congress of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (JSAO) and The 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFAO) / October 28-31, 2007 / Osaka
17. H. Horinouchi, T. Ikeda, N. Izawa, H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida, K. Kobayashi, E / Long term survival study after resuscitation of hemorrhagic shock model in beagle dog: Hb-vesicles has an equal potentiality for resuscitation compared to the autologous blood. / 2007 Joint Congress of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (JSAO) and The 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFAO) / October 28-31, 2007 / Osaka
18. 堀之内宏久／救急災害医療に対応できる人工赤血球の開発、ショックにおける投与の安全性、虚血モデルでの研究成果／平成19年度研究成果発表会「人工血液をつくる(8)」／2008.2.11／慶應義塾大学医学部北里講堂
- G. 知的財産権の出願、登録状況 (予定を含む)
該当なし

分担研究報告書

血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体の救急医療への応用に関する研究

分担課題：ラット出血性ショックモデルにおけるHb小胞体の輸液蘇生の生体反応
主要臓器における炎症反応と低酸素反応

分担研究者	坂本 篤裕	日本医科大学	麻酔科	教授
	寺嶋 克幸	日本医科大学	麻酔科	講師
	杖下 隆哉	日本医科大学	麻酔科	助手
	山梨 義高	日本医科大学	麻酔科	大学院

研究要旨

昨年度の研究に引き続き、出血性ショックモデルに対する輸液蘇生後の各臓器の炎症反応や低酸素反応を、同種血輸血とHb小胞体(HbV)分散液による違いで比較検討した。雄性SDラットを対象とし、ペントバルビタール静注により全身麻酔導入後気管挿管を行った。脱血により平均血圧30-40 mmHgを30分間維持した。脱血量と等量の、1) 同種血赤血球輸血液 (MAP群)、または 2) HbV小胞体分散液 (HbV群) で輸液蘇生し、2時間後または、24時間後に犠牲死させた。両群とも蘇生後速やかに動脈血Base Excess値や血漿乳酸値が回復した。摘出した肺のTNF- α 、IL-6、HIF-1 α 、HO-1、ICAM-1、iNOS、eNOSのmRNAを測定した。HbV分散液は同種血赤血球輸血液とほぼ同様のmRNA発現反応を示した。ただし、2時間後のTNF- α のmRNAはMAP群に比べHbV群で強く発現していた。HbV分散液は、同種血赤血球輸血液とほぼ同等の炎症反応と末梢酸素運搬能の影響を持つことが示唆された。

A. 研究目的

人工酸素運搬体の臨床使用目的には、外傷性大量出血や遠隔地医療、予想外の大量出血における緊急的酸素運搬体の補充が想定される。近年、重症外傷性出血に対する早期大量輸血が肺換気障害や死亡率の増加の原因となりうる事が報告されている。これは、好中球や補体などの生体内免疫系の活性化による臓器障害が原因とされている。

一方、出血性ショックによる腹腔臓器の虚血再灌流はリンパを介した肺への炎症反応の波及を生じるため、できるだけ早期の輸液・輸血蘇生と引き続く速やかな止血処置が望ましい。

我々は、以前、Hb小胞体(HbV)分散液自体による炎症反応と組織低酸素への影響を乳酸リンゲル液

と比較し、同等であったことを報告した。現在赤血球輸血として使用されているMAP製剤が肺を含む臓器障害を引き起こす原因であれば、HbV分散液と同種赤血球MAP溶液とで輸液蘇生された動物に差が見られるはずである。本年度の研究目的は、出血性ショックモデルに対する輸液蘇生としてのHbV分散液と同種赤血球MAP溶液の与える影響を調査することである。

B. 研究方法

1. 動物の準備

週齢10-13週の雄性SDラット36匹を対象とした。尾静脈を確保し、ペントバルビタール30 mg/kg静注にて麻酔導入し気管挿管を行った。麻酔維持はペ

ントバルビタールの追加静注で行った。大腿動静脈にカニューレーション後、安定させた（ベースライン：BL）。

2. 同種血赤血球MAP溶液の作成

対象とは別の新たな週齢10-13週のSDラット6匹から脱血し、採取された血液に血液保存液ACD-A液（川澄科学）を添加し、4000 rpm×6分間遠心分離を行った。血漿と Buffy Coat を除去し、MAP液（川澄科学）を添加し4℃で3週間保存した。3週間後、15 Gyの放射線照射を行い、T-リンパ球の不活性化をおこなった。これをHb濃度が 8.6 g/dLとなるようにリコンビナントヒトアルブミン溶液に分散し、調節した。

3. 輸液蘇生方法

ベースラインの測定後、脱血により平均血圧が 30 - 40 mmHgとなるように30分間維持し、出血性ショックモデルを作成した。その後、動物を無作為に輸液蘇生液（リコンビナントヒトアルブミン加HbV小胞体分散液、または、同種血赤血球MAP液）と犠牲死させるまでの時間（2時間と24時間後）により4群に分けた。脱血量に対して等量のリコンビナントヒトアルブミン加HbV小胞体分散液（[Hb] = 10 g/dLの生理食塩水に分散されたものにリコンビナントヒトアルブミン溶液を加え、[Hb] = 8.6 g/dLに調整）、または、上記同種血赤血球MAP液で輸液蘇生を行った（HbV-2H, HbV-24H群、または、MAP-2H, MAP-24H群）。また、sham群として、ベースライン測定後、脱血を行わず、以下の測定のみを行った。各群ともそれぞれn = 6とした。

4. 血圧測定と動脈血ガス分析

採血（0.2 mL）は、ベースライン、脱血後30分、輸液蘇生直後、1、2時間後に行い、Base Excess (BE) と乳酸値を測定した（Radiometer社製、ABL 700）。平均動脈圧と中心静脈圧は圧トランスデューサー（日本光電社製、TP-300T）で、輸液蘇生後犠牲死

まで最大24時間行った。

5. mRNA発現の測定

2, 24時間後の各群は、最後の採血と圧測定後直ちに犠牲死させ、肺を摘出した。摘出された臓器は、直ちに液体窒素で処理された後、mRNAの抽出まで-80℃で保存された。プライマーエクスプレスソフトウェア（Applied Biosystems社製）でデザインされたPCRプライマーとTaqMan蛍光プローブを用いて、肺でのTNF-1 α , IL-6, HIF-1 α , HO-1, eNOS, iNOS, ICAM-1のmRNA発現をABI PRISM 7700 Sequence Detector（Applied Biosystems社製）で測定し、比較CT法にて相対値を求めた。

6. 統計

データは平均±標準偏差、または、平均±標準誤差で示した。血圧、乳酸値、mRNAの発現率の群間の比較は、Mann-Whitney U testで、群内の比較はWilcoxon t-testで検定した。危険率0.05未満を有意差ありとした。

7. 倫理的配慮

この研究は、日本医科大学動物実験倫理委員会に承認された。実験動物に関しては、十分な麻酔下にて実験を試行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

C. 結果

1. 動脈血圧、中心静脈圧、BE、乳酸値の変化

今回の出血性ショックモデルは、中心静脈圧には明らかな影響を及ぼさなかったが、平均動脈圧やBE、乳酸値には影響を示した（Figs. 1 - 4）。

平均動脈圧は、脱血により低下し、HbV分散液またはMAP溶液いずれの等量輸液蘇生で血圧は速やかに回復した。その後2時間までは血圧は無輸液でも保たれるようである。また、無輸液による動物のプレパレーションでは若干の血圧低下を来たすようである（sham群）。

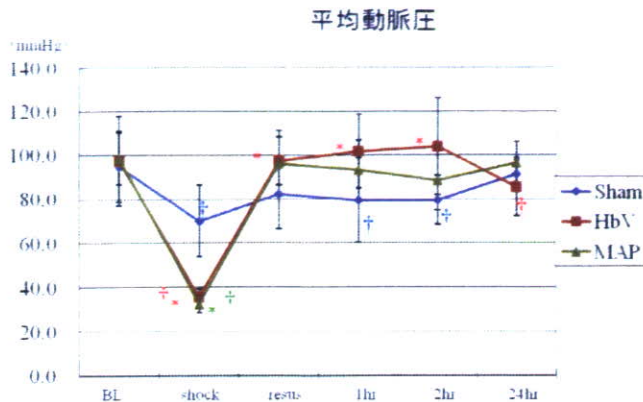


Fig. 1. 平均動脈圧の変化

*sham群に対する比較, †BLに対する比較, いずれも $p < 0.05$. データはすべて平均±標準偏差.

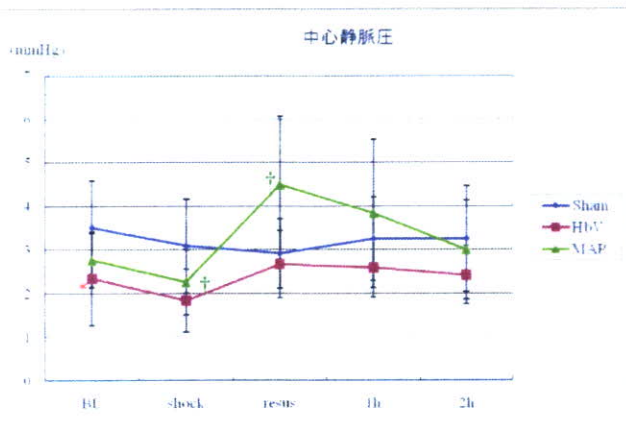


Fig. 2. 中心静脈圧の変化

*sham群に対する比較, †BLに対する比較, いずれも $p < 0.05$. データはすべて平均±標準偏差.

脱血によりBEは低下し乳酸値は増加したが、輸液蘇生により速やかに回復し、その後も維持された。そのHbV溶液の効果は、MAPと同等であった。BEの変化においても乳酸値の変化においても、蘇生後1時間の時点でSham群は一過性に悪化しているように見える。おそらく、プレパレーションによる侵襲と脱血が同時に起こることによって体液の血管内方向へのシフトが一過性に起こり、その後の輸液蘇生により蘇生群の見かけ上の優位性を示したものと考えている。しかし、その後24時間以内には出血-蘇生された動物とsham群の動物では、BE値や乳酸値は同等となる。

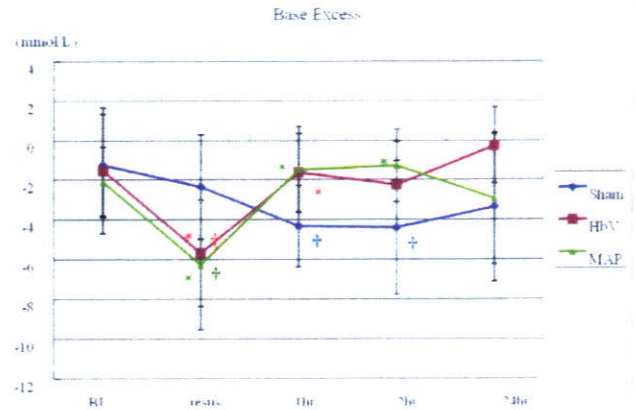


Fig. 3. Base Excessの変化

*sham群に対する比較, †BLに対する比較, いずれも $p < 0.05$. データはすべて平均±標準偏差.

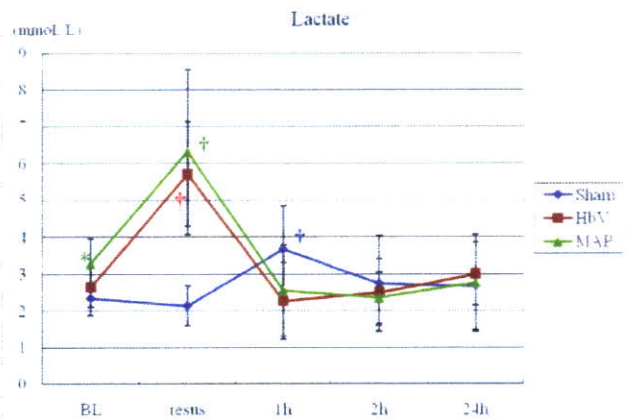


Fig. 4. 血漿乳酸値の変化

*sham群に対する比較, †BLに対する比較, いずれも $p < 0.05$. データはすべて平均±標準偏差.

2. 肺におけるmRNAの発現

HbV分散液またはMAP溶液による輸液蘇生後の肺のmRNA発現は、両群ともほぼ同等であった。ただし、蘇生後2時間ではTNF- α はHbV溶液による蘇生群のほうがむしろ高かった。しかし、蘇生後24時間では両群間の差は見られなかった。一方、より遅く発現すると考えられている、炎症性サイトカインであるIL-6のmRNAはいずれの時点でも差は見られなかった。組織低酸素症により発現するHIF-1 α も両群間に差は見られず、炎症やHb投与後

に発現するHO-1も両群間に差はなかった。炎症や虚血・低酸素ストレスによるNOSの発現も両群間に差は見られなかった。血管内皮細胞刺激によるICAM-1の誘導も蘇生後2時間、24時間の時点で両群間に差は見られなかった。

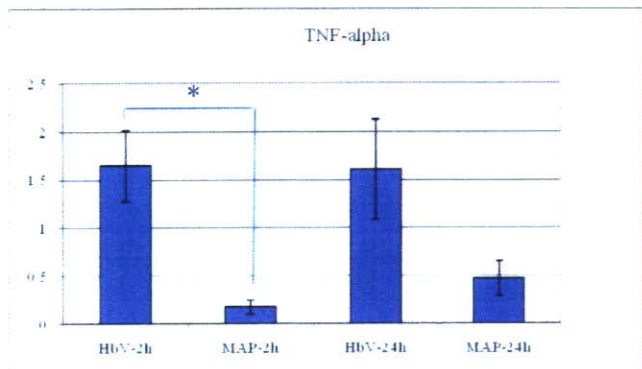


Fig. 5. 脱血性ショックー輸液蘇生後の肺におけるTNF- α mRNAの発現
* $p < 0.05$. データは平均 \pm 標準誤差.

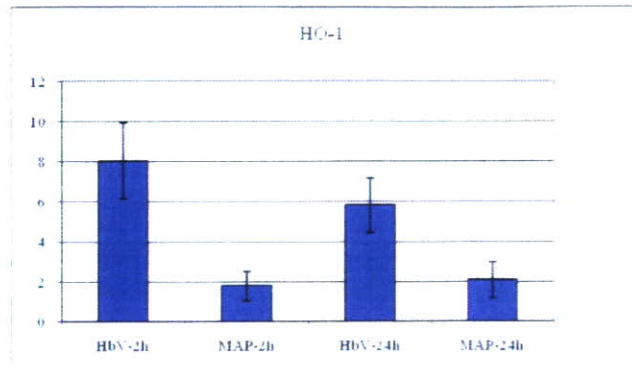


Fig. 8. 脱血性ショックー輸液蘇生後の肺におけるHO-1 mRNAの発現
データは平均 \pm 標準誤差.

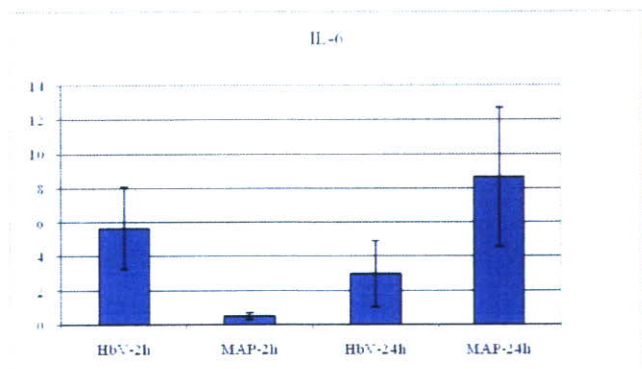


Fig. 6. 脱血性ショックー輸液蘇生後の肺におけるIL-6 mRNAの発現
データは平均 \pm 標準誤差.

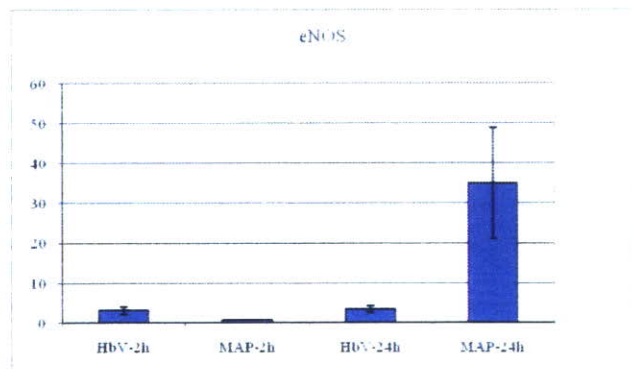


Fig. 9. 脱血性ショックー輸液蘇生後の肺におけるeNOS mRNAの発現
データは平均 \pm 標準誤差.

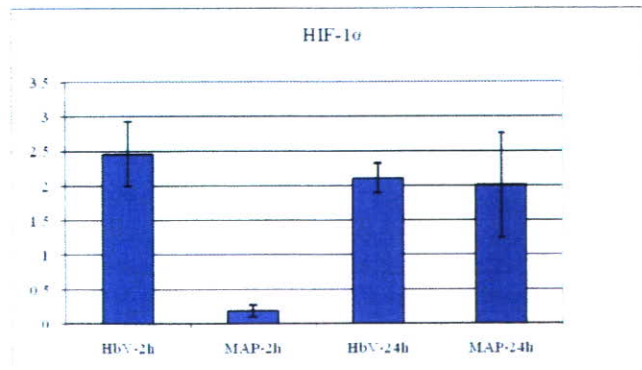


Fig. 7. 脱血性ショックー輸液蘇生後の肺におけるHIF-1 α mRNAの発現
データは平均 \pm 標準誤差.

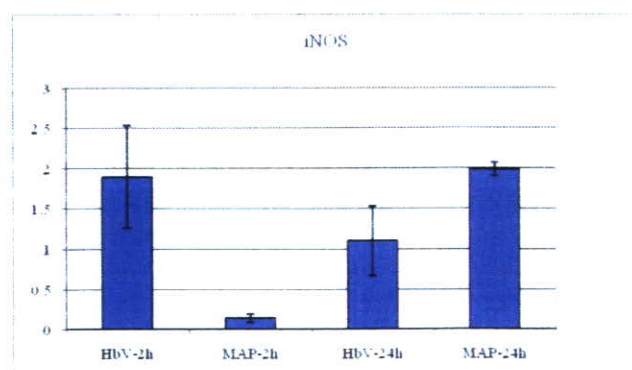


Fig. 10. 脱血性ショックー輸液蘇生後の肺におけるiNOS mRNAの発現
データは平均 \pm 標準誤差.

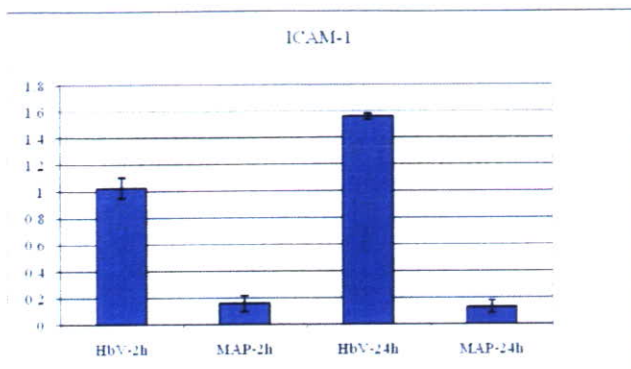


Fig. 11. 脱血性ショック輸液蘇生後の肺におけるICAM-1 mRNAの発現
データは平均±標準誤差.

D. 考察

保存赤血球は受血者体内での免疫反応に基づく副作用が問題となる。近年の報告では、外傷性出血患者に対する大量の赤血球輸血は、ARDS（肺）や多臓器不全の発生率を増加させ、その保存血の保存期間が長いほど多臓器不全の発生率が高いことが知られている。この原因には、保存血に混入する白血球や補体の影響が考えられている。今回我々が使用した人工酸素運搬体は、高度に精製されたヒトHbを原料とするものであり、投与動物に対する免疫学的反応に基づく炎症反応が生じる可能性が低いと推測された。また、一方でその人工酸素運搬体自体の大量投与による臓器炎症反応を調査する必要性があった。HbV溶液は、MAP溶液とほぼ同等の肺への反応を示した。そして、むしろ投与早期にはTNF-1 alphaのmRNA発現を増加させた。ただし、この反応は一過性であり、24時間以内にはMAP溶液による蘇生群と差が見られなかった。

救急/災害時や周術期の貧血に対して赤血球輸血で治療されている。しかし、緊急時には投与前の患者の血液型検査やクロスマッチングテストによる時間的制約や遠隔地での輸血用血液供給の問題による迅速な対応が遅れる、供給血液量の不足の可能性などの制限を受ける。このような、特殊な状況下での人工酸素運搬体の利用は、生体内反

応からも赤血球MAP製剤に代わる物として利用できる可能性を、今回の実験結果が示唆するものである。

今回のMAP溶液の作製にあたり、現在我々が臨床使用している血液製剤に極めて近似した方法で作製した。また、保存期間延長による多臓器不全の発生の増加を考慮しつつ、近年わが国で保存期間短縮の変更があったことも考慮した。そこで、MAP溶液作製後3週間の4℃による保存を行った。さらに、残存白血球の影響を考慮し、また、臨床に即して投与前の放射線照射を行った。このようなMAP溶液の循環血液量30-40%に相当する投与量では、HbV溶液による蘇生と同等であることがわかった。

今後の研究として、2時間後のTNF-1α mRNAの発現の局在を組織染色により同定し、その機序を解明する。

E. 結論

出血性ショックモデルに対するHbV小胞体分散液を用いた輸液蘇生後の肺の生体反応は、MAP溶液を用いた輸液蘇生と同等であり、極めて軽微で一過性ある。HbV溶液は緊急時の輸液蘇生として循環血液量30-40%相当の投与において、現在使用されている赤血球MAP製剤に相当する蘇生効果を持つ。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. 杖下隆哉、寺嶋克幸、坂本篤裕. 人工赤血球(HbV)と酸素運搬機能および組織酸素代謝. 至適Hbレベルならびに人工赤血球の展望. *体液・代謝管理* 23, 35-42 (2007).

2. 学会発表

1. 山梨義高、寺嶋克幸、杖下隆哉、坂本篤裕／ラット出血性ショックモデルにおけるHb小胞体の輸液蘇生の主要臓器生体反応／第14回日本血液代替物学会／2007.6.14／東京

H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

該当なし

分担研究報告書

血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究

分担課題： 1. Hb小胞体による出血性ショック蘇生後14日間の回復過程
2. 完全合成型人工酸素運搬体（アルブミン-プロトヘム）の開発

分担研究者	小松 晃之	早稲田大学 理工学研究所 准教授
	土田 英俊	早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員・早大 名誉教授
	酒井 宏水	早稲田大学 理工学研究所 准教授
	中川 晶人	早稲田大学 理工学研究所 助手

研究要旨

(1) Hb小胞体(HbV)が出血ショック蘇生液として有効であることが明らかにされているが、その後の中長期的な回復過程については十分に検討されていなかった。そこでラットモデルを用い、蘇生後14日間の回復過程を検討した。ラットの循環血液量の50%を脱血しショック状態とした後、リコンビナントアルブミン溶液に分散させたHbV、または脱血液を投与した。両群とも循環動態、血液ガス組成が直ちに回復し、有意な差を認めなかった。HbV群のヘマトクリット値は、7日後には正常値に回復した。両群ともAST, ALT, LDHが1日後に亢進した。再灌流傷害に起因すると考えられ、蘇生手順に課題を残した。HbV捕捉と造血に起因する脾臓肥大は、14日後には消失した。また、HbVが肝脾で消失するに伴い、PEG鎖も消失することを抗PEG抗体免疫染色から確認した。以上より、HbVは血液と同等の蘇生効果を示し、投与したHbVの分解と造血に支障が無いことを確認した。

(2) 完全合成型人工酸素運搬体の開発については、リコンビナントアルブミン変異体(rHSA)にプロトヘム(heme)を結合させたrHSA-hemeを対象に、遺伝子組換え技術を用いて最適分子構造の探索と合成を行った。具体的には、プロトヘムのプロピオン酸残基とイオン結合を形成しているアルブミンのHis-146およびLys-190をかさ高い強塩基性のアルギニンに置換することで、これまで二種類観測されていたrHSA-heme系の酸素親和性を一つにすることができた。これはヘムポケット開口部の大きさを狭めることにより、rHSA内におけるプロトヘムの配向構造を一方向に制御できたためと考えられる。酸素運搬効率のより高いrHSA-hemeの合成が可能となった。

1. Hb小胞体による出血性ショック蘇生後14日間の回復過程

A. 研究目的

現行の献血・輸血システムが医療に貢献してきたことは論を俟たないが、未だに多くの未解決課題を抱えている。高額なNAT検査を経ても病原体

混入の可能性を完全に否定できない、医療過誤による血液型の不適合、またGVHDなど様々な免疫学的副作用もある。安全な輸血を目指してガイドラインが度々改訂され、同種血輸血の回避、あるいは使用量低減の為に、今では輸血開始の目安を6 g/dLにまで低下させている。

人工酸素運搬体は、病原体を含まず、血液型が

無く、血液成分由来の免疫反応は起こりえず、同種血輸血よりも優れているといえる。また、長期間保存できる点も輸血より優れ、備蓄と緊急時の投与を可能にするものと期待される。Hb小胞体(HbV)は、リン脂質小胞体に高純度高濃度Hb溶液を内包した人工赤血球である(粒径250 nm)。赤血球と同様の細胞構造により、時に毒性を呈するHb分子と血液成分との接触、或は血管内皮との接触を妨げ、Hbの毒性を遮蔽する。これまでにHbVの機能と安全性の評価は、正常の動物を対象に行われ、赤血球と同等の酸素運搬機能を有すること、また細網内皮系に捕捉された後、支障無く代謝される過程等が詳細になっている。しかし、特定の病態に対するHbV投与と、その後の中長期的な回復過程については、詳細な検討が為されていなかった。

そこで本研究では、循環血液量の50%を脱血した出血性ショック状態にあるラットに対してHbVを投与した後、14日間の観察を行った。特に血液生化学検査や、細網内皮系の組織病理の観察を行い、安全性に関する知見を得ることを目的とした。

B. 実験方法

1. HbV分散液の調製

HbV分散液は無菌条件下、既報に従って調製した。Hb溶液は日本赤十字社(東京)から提供を受けた期限切れ非使用赤血球から精製した。HbVの内水相には高濃度のHb(38 g/dL)と共に、アロステリック因子としてpyridoxal 5'-phosphate (PLP, 14.7 mM)がモル比でPLP/Hb = 2.5になるように添加した。HbVの膜成分である脂質は、日本精化社製のPresome PPG-I (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine), cholesterol, 1,5-bis-*O*-hexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate = 5/5/1 (モル比)に、0.3 mol% の 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamine-*N*-poly(ethylene glycol) (PEG-DSPE, 日本油脂社製)を混合して用いた。HbVは生理食塩水に分散、フィルター滅菌し(Dismic、東洋濾紙社製: 0.45 μ m)、窒素通気により酸素を除去して保存し

である。このHbV分散液8.6 mLに対し、1.4 mLのリコンビナントヒトアルブミン溶液(25 wt%, ニプロ社より提供)を混合し、フィルタ処理(Dismic 0.45 μ m, Advantec)を行った。Hb濃度は8.6 g/dL、外水相のアルブミン濃度は約5 g/dLに調節される。

2. 動物実験の方法

Wistar系ラット(♂、体重274 \pm 26g, 59匹)を吸入麻酔下(1.5% Sevoflurene)、左大腿動・静脈に挿管(SP-31, 夏目製作所)、動脈より循環血液量の50%を脱血し、15分後に同量の蘇生液を静脈内投与した。蘇生液は、リコンビナントアルブミンに分散させたHbV ([Hb] = 8.6 g/dL)と、SAB (Shed autologous blood, [Hb] = 13.4 \pm 2 g/dL)である。測定項目として、血圧、心拍数 (Polygraph 1000, 日本光電)、血液ガス組成(ABL 700, Radiometer)、Hct値、血中サイトカインについては、脱血前、脱血後、投与直前、投与直後、1, 3, 6時間後に測定を行った。6時間後の測定を終了後、大腿動静脈のカテーテルを外し縫合して覚醒、最長14日間生存させた。犠牲死させる際には、Sevoflurene吸入麻酔下、右大腿動脈に挿管し、同様の測定を実施した。また、開腹して下大静脈より採血して遠心分離を行い、得られた血漿について生化学検査を実施した(BML社に依頼)。但し、HbV投与1-3日目ではHbVが血漿に残存しているので、超遠心分離により完全にHbVを沈降除去したものを検体とした。

ラットは放血犠牲死させ、摘出した脾臓、肝臓の重量測定の後、10%中性ホルマリン溶液で固定した。組織病理学的検討としては、H/E染色、Berlin Blue 染色、および抗PEG抗体免疫染色を行った(rabbit monoclonal antibody [PEG-B-47] against PEG, Abcam PLC)。

サイトカイン測定検体は、Hct値測定後の硝子キャピラリー管上部の血清を採取して冷凍保存した。解凍後、20 μ Lを採取し遠心分離を行い、アンタイボディオミクス法(Bio-Plex Protein Array System, Bio-Rad社製)により合計9種類のサイトカインを測

定した(IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, INF- γ , TNF- α).

統計的解析には、Stat View (Ver. 5.0, Avacus Concepts)を用いた。血行動態や血液ガス組成など、経時的変化におけるベースラインとの比較には paired t-test検定を行った。また、同じ測定時間における群間比較には、ANOVAおよびFisher's PLSDを

用いた。生化学検査の群間比較には、unpaired t-testを用いた。P<0.05のとき有意差と判定した。

C. 結果

出血ショック蘇生液としてHbVの投与を受けたラット24匹のうち、20匹が6時間の麻酔状態を生存した。大腿動静脈のカテーテルを外し、縫合、覚醒

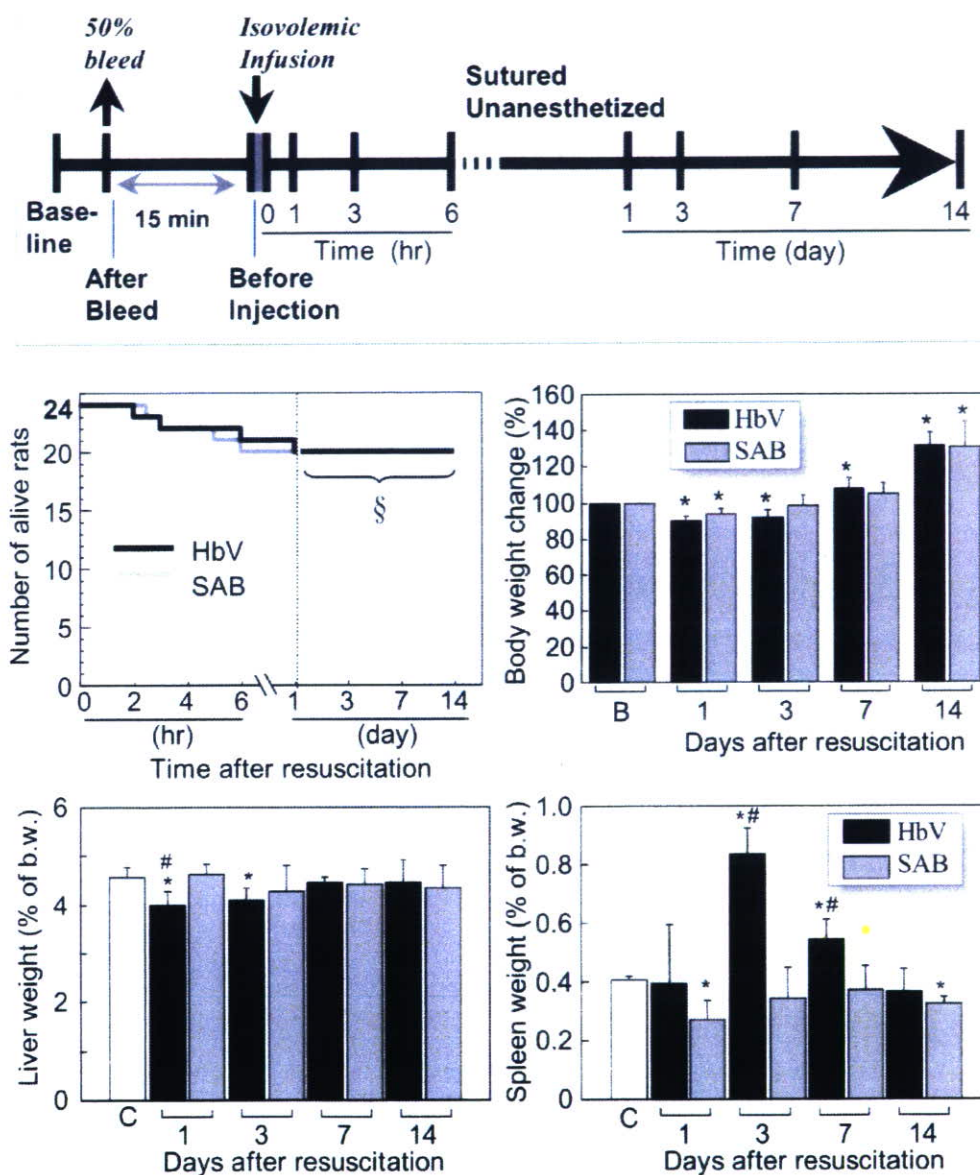


Fig. 1. (Top) Scheme of the experimental protocol. **(Middle left)** Number of survived rats after resuscitation from hemorrhagic shock with HbV or SAB. The 20 rats survived hemorrhagic shock and resuscitation for 6 h in anesthetized condition. The catheters in the femoral artery and vein were removed, and the rats were un-anesthetized and housed in cages. § During this period, all the rats survived until intended sacrifice (survival rate, 100%) after non-anesthesia for up to 14 days. Among 20 rats, 5 rats each were sacrificed for examination at 1, 3, 7, and 14 days. **(Middle right)** Body weight changes (%) of Wistar rats after resuscitation from hemorrhagic shock with HbV or SAB. Mean±SD. No significant difference was found between the groups ($n = 5$). * $p < 0.05$ vs. baseline. B, Baseline. **(Bottom)** Weight ratios of liver and spleen to body weight at 1, 3, 7, and 14 days after resuscitation with HbV or SAB. Mean±SD. * $p < 0.05$ vs. baseline, # $p < 0.05$ vs. SAB ($n = 5$). C, Control group.

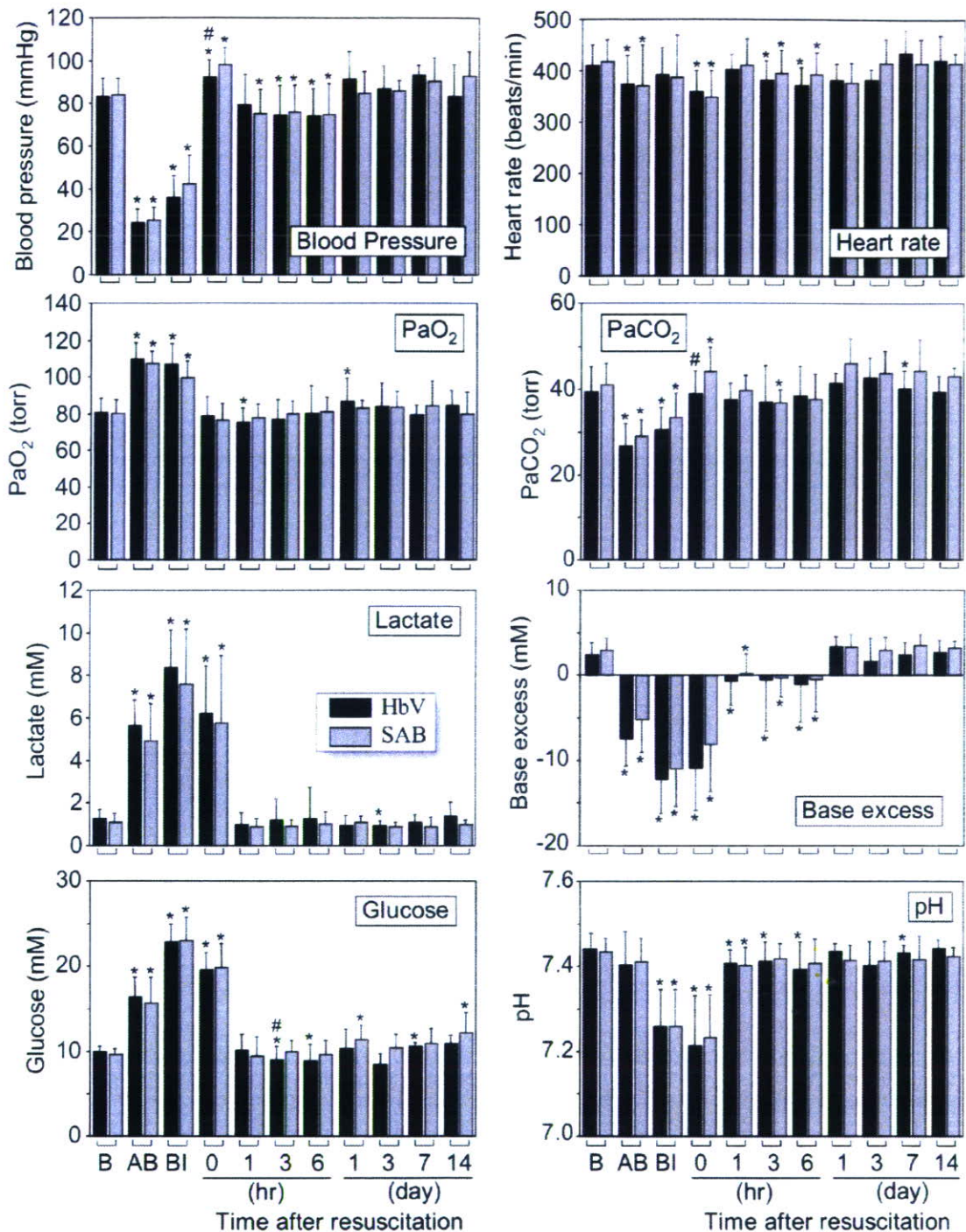


Fig. 2. Hemodynamic and blood gas parameters during and after the hemorrhagic shock and resuscitation with HbV or SAB for 6 h in anesthetic condition and the succeeding 14 days. PaO₂, arterial blood oxygen tension, PaCO₂, arterial blood carbon dioxide tension. Mean±SD. **p*<0.05 vs. baseline. # *p*<0.05 vs. SAB (B-6hr, *n* = 24; 1-14 days, *n* = 5). B, Baseline; AB, after bleeding; BI, before injection.

させ、最長14日間生存させた。覚醒後は全例が犠牲死させるまで生存した(**Fig. 1**)。脱血液の投与(SAB群)でも全く同様の傾向を示した。体重(ベースライン; HbV群, 274±21 g; SAB群, 287±41 g)は、1日後に両群とも10%程度低下したが、その後は増加し続け、

14日後にはベースラインの130%にまで増大した。両群に有意な差は無かった。

HbVの脾臓重量は、3日後、7日後に有意に増大した。この脾臓肥大は、主にHbVが捕捉されることに起因し、3日後に最大値を示す。しかし14日後には

完全に消失した。SAB群では脾臓肥大は見られず、寧ろ1日後に収縮する傾向が認められた。これは、脾臓にあった血液が出血性ショックにより放出されるautotransfusionに起因しているのかもしれない。肝臓重量には脾臓ほどの変化は無かったが、HbV群で1日後、3日後に減少する傾向が認められた。

出血前の平均動脈血圧(MAP)は、 84 ± 8 mmHgであ

ったが、循環血液量の50%を脱血した時点で 25 ± 6 mmHgにまで低下した。15分後(投与直前)には、僅かに上昇し、 39 ± 12 mmHgになった(Fig. 2)。蘇生液の投与後、HbV群、SAB群共に急速に回復し、ベースラインより若干高め(overshooting)になった。1時間後には約75 mmHgにまで戻り、その後6時間安定した値を推移した。Overshootingは恐らく、組織からのautotransfusionと、脱血量と同量の蘇生液を投与したため、循環血液量が過剰になったこと、また心臓から離れた大腿動脈の血圧を計測していることも影響していると考えられる。血圧はその後14日間安定に推移した。心拍数(HR、ベースライン 414 ± 41 beats/min)は、ショックによって低下する傾向もあるが、麻酔期間の6時間、および覚醒後の14日間ともにほぼ安定した傾向を示した。

動脈血酸素分圧(PaO₂、ベースライン 81 ± 8 torr)は、脱血後に 109 ± 8 torrに、また動脈血二酸化炭素分圧(PaCO₂、ベースライン 40 ± 5 torr)は、 28 ± 5 torrに低下した。これはショックに伴う代償機能として換気量が増大した為である。乳酸値も 1.2 ± 0.4 mMから出血後に 5.3 ± 1.5 mMに上昇し、15分後には 8.0 ± 2.2 mMに到達した。代謝性アシドーシス(pH = 7.26 ± 0.09)が脱血15分後に顕著となった(ベースライン 7.44 ± 0.03)。塩基余剰(BE、ベースライン 2.7 ± 1.4 mM)は、出血15分後に -11.7 ± 4.2 mMにまで低下した。血糖値(ベースライン 9.8 ± 0.7 mM)も出血15分後に、 23.0 ± 2.4 mMにまで増大した。蘇生液投与の直後、両群ともPaO₂、PaCO₂は急速な回復を示したが、pH、乳酸値、血糖値は完全な回復に1時間を要した。また、BEは6時間でも完全には回復せず、1日後に完全に回復していた。両群で有意な差は認められなかった。

ヘマトクリット(Hct、ベースライン、 $40 \pm 2\%$)は、出血15分後に $30 \pm 3\%$ にまで低下した。これは、autotransfusionによって組織液が血管内に入るため、血液が希釈されたことに起因すると考えられる(Fig. 3)。SAB群では投与後直後に、 $36 \pm 2\%$ に増大し、さらに1時間後には $41 \pm 3\%$ に増大した。その後14日

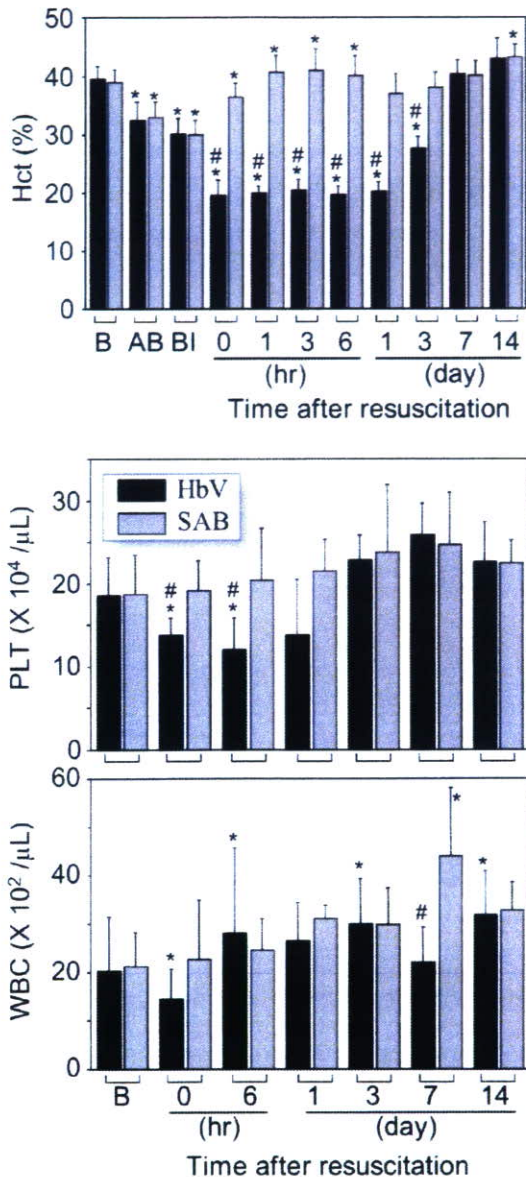


Fig. 3. Hematocrit (Hct) and the numbers of platelets (PLT) and white blood cells (WBC) during and after hemorrhagic shock and resuscitation with HbV or SAB for 6 h in anesthetic condition and the succeeding 14 days. Mean±SD. * $p < 0.05$ vs. baseline. # $p < 0.05$ vs. SAB (B-6 h, $n = 24$; 1-14 days, $n = 5$). B, Baseline; AB, after bleeding; BI, before injection.

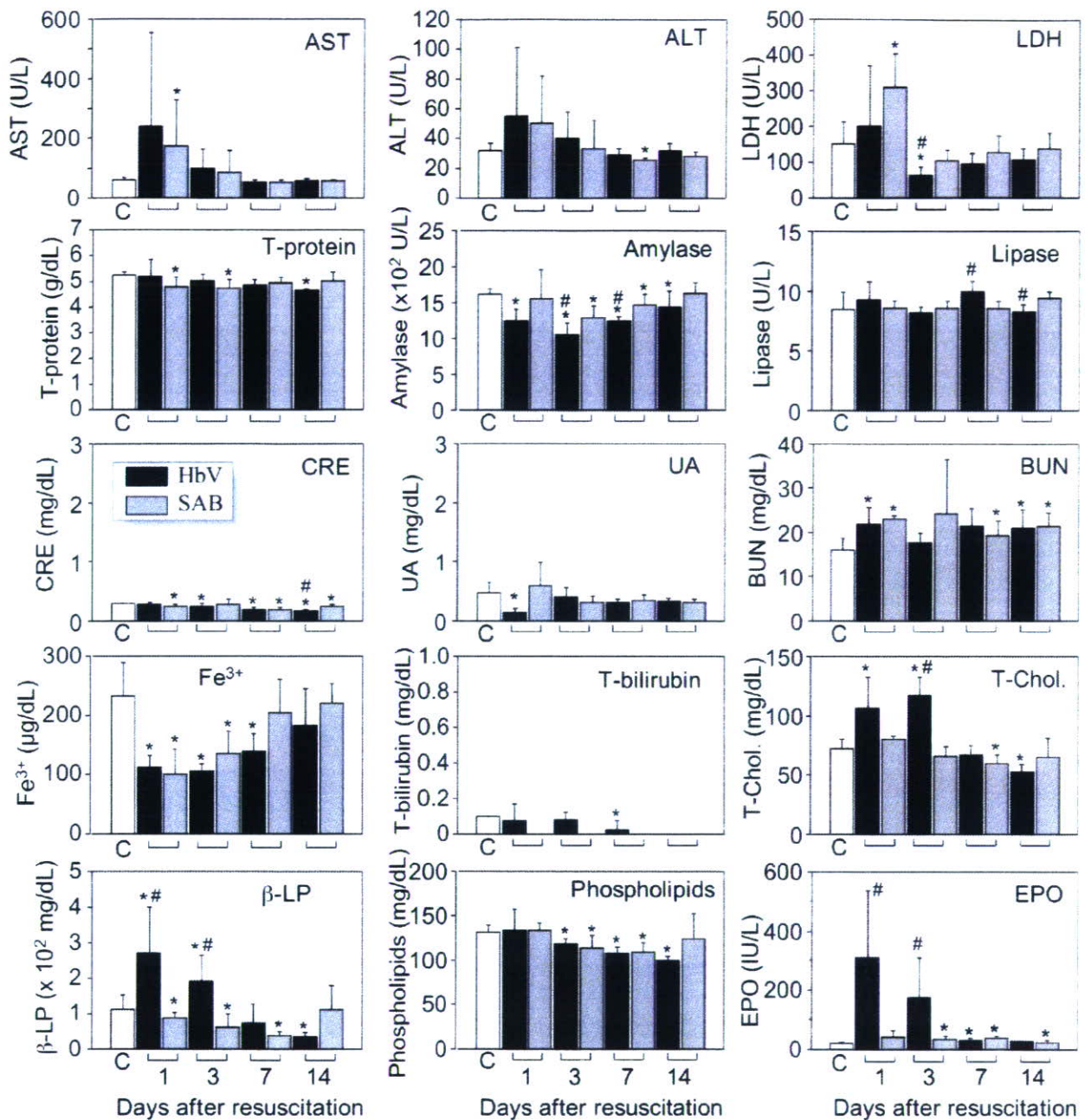


Fig. 4. Plasma enzyme levels at 1, 3, 7, and 14 days after resuscitation with HbV or SAB. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; T-protein, total protein; CRE, creatinine; UA, uric acid; BUN, blood urea nitrogen; T-bilirubin, total bilirubin; T-Chol., total cholesterol; β-LP, β-lipoprotein; EPO, erythropoietin. Mean±SD. **p*<0.05 vs. control group (*n* = 5). C, Control group.

間高い値を推移した。HbV群では、投与後にHctは20±7%にまで低下し、その後6時間安定な値を推移した。その後7日経過するHctはベースラインの値にまで戻り、更に14日後にはこれを超える値となった。血小板数(PLT)はHbVによる蘇生で有意に低下したが、これは希釈の効果と考えられる。3日後には正常値にまで回復し、赤血球(Hct)よりも早い回復で

あった。白血球数(WBC)に関しては、ばらつきが大きく、特に意味のある変化は無かった。蘇生直後のHbV由来の血中Hb濃度は3.6±0.8 g/dLで6時間ほぼ変化無く推移したが、1日後には2.8±0.6 g/dL、3日後には1.6 g/dLにまで低下し、7日後には検出されなかった。

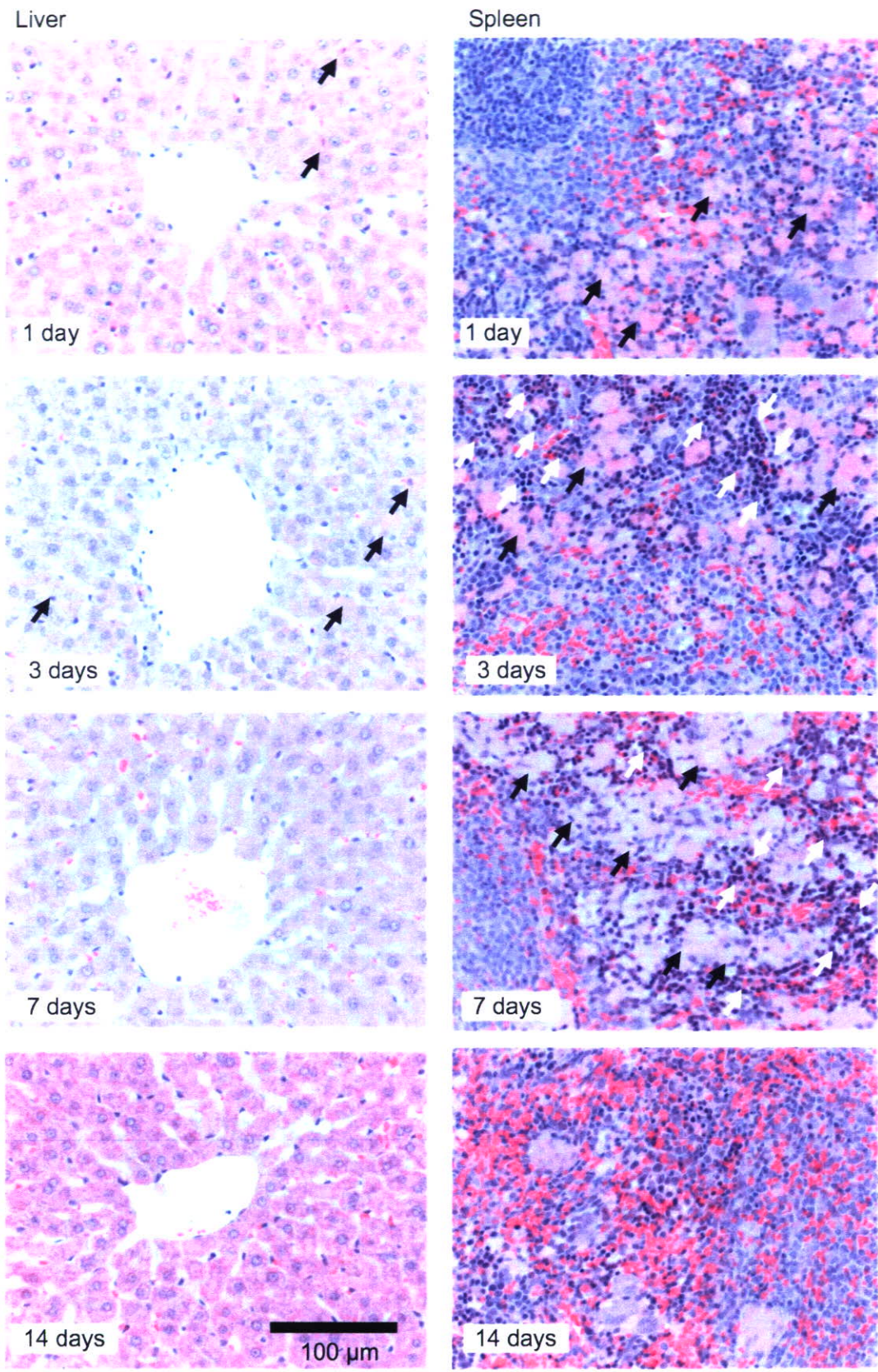


Fig. 5. Histology of rat liver and spleen of HbV group at 1, 3, 7, and 14 days after resuscitation. H/E staining. Black arrows indicate the presence of spleen macrophages and liver Kupffer cells phagocytizing HbV particles. HbV disappeared completely at 14 days. The white arrows in the spleens indicate nests of erythroblasts in the red pulp zone, reflecting enhanced extramedullary erythropoiesis.

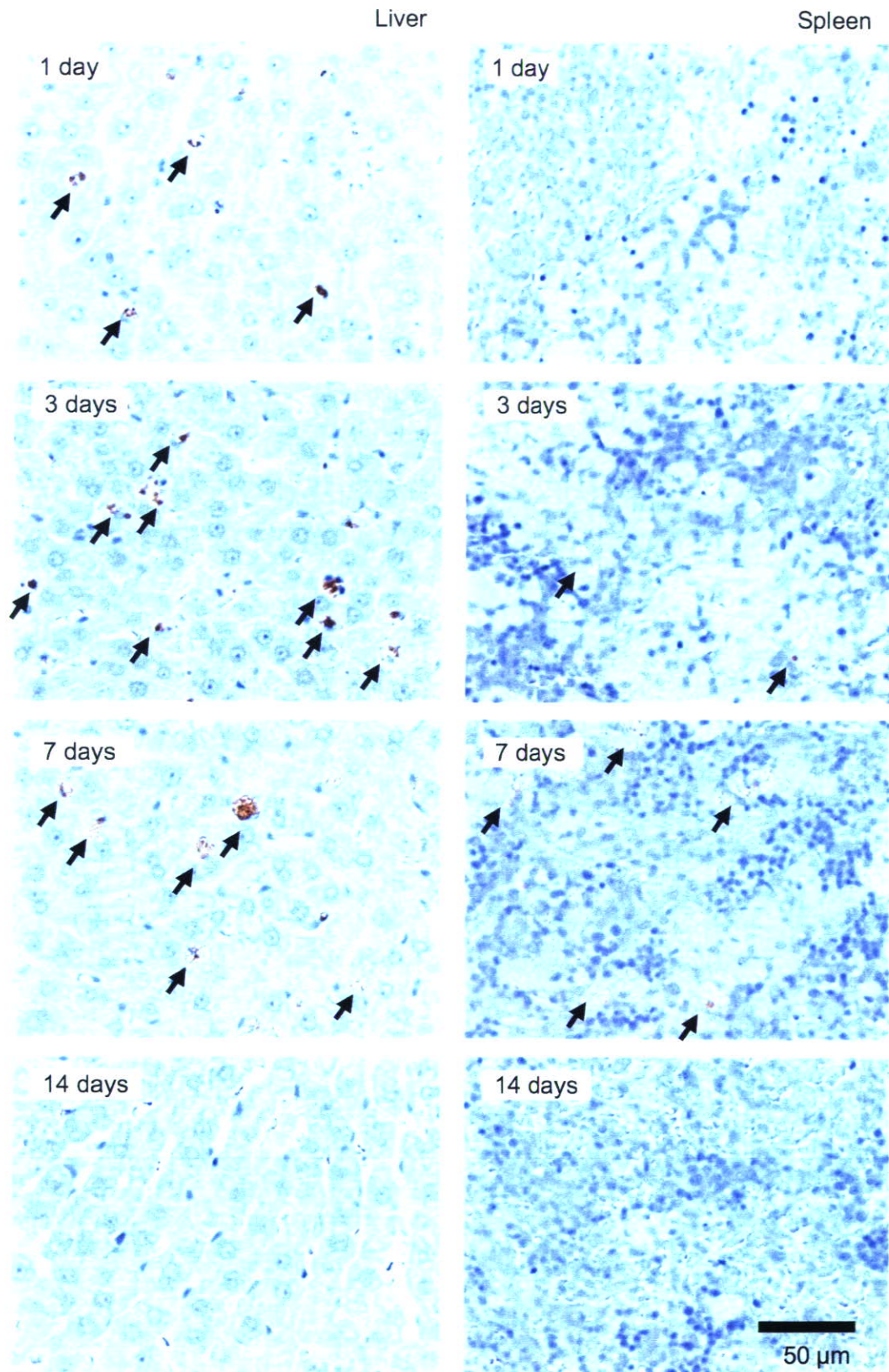


Fig. 6. Immunohistochemical staining with anti-methoxy-PEG antibody. Black arrows indicate stains in the liver Kupffer cells and spleen macrophages. Staining was detectable at 1 day in the liver, but not in the spleen, even though the amount of HbV is much larger in the spleen. In the spleen, the strongest staining was observed at 7 days after resuscitation. These results indicate that the PEG-antibody had difficulty in recognizing PEG on the surface of HbV, and that the degradation of HbV in the spleen macrophage is much slower than that in the Kupffer cells.

metHb含量は、6時間後には37±3%、1日後には83.4%にまで増大していた。

血液生化学の結果、1日後に両群ともアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニン・アミノトランスフェラーゼ(ALT)、乳酸脱水素酵素(LDH)が上昇する傾向が認められた(Fig. 4)。しかし3日後には正常値に復していた。総タンパク(T-protein)は特に変化は無かった。アミラーゼは低下傾向にあったが、リパーゼには著変は認められなかった。クレアチニン(CRE)、尿酸(UA)、血中尿素窒素(BUN)には変化が認められたが、群間に有意な差は無かった。両群ともFe³⁺の顕著な低下が見られたが、14日後には回復し、またSABの方がHbV群よりも早く見られた。総ビリルビン(T-bilirubin)は、全実験期間を通して低い値を推移した(<0.1 mg/dLの検出限界)。総コレステロール(T-Chol)およびβリポ蛋白(β-LP)はHbV群で蘇生後1日後、3日後に高値を示したが、7日後にはベースラインのレベルまで低下した。リン脂質は両群とも低下傾向を示した。エリスロポエチンはHbV群が1, 3日後にSAB群に比較して有意に高い値を示した。

血中のサイトカインについては、IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, GM-CSFの項目について検討をしたところ、著変は認められなかった。IL-10の若干の上昇(<50 pg/ml)が両群で、またTNF-αがHbV群で6時間後に認められた(<50 pg/ml)。しかしこれらは、lipopolysaccharideを投与した敗血症モデルでの値(TNF-α, 4000 pg/mL; IL-10, 100 pg/mL)に比較すると極めて軽微であった。

組織病理検査の結果、HbV群1日後では脾臓マクロファージと肝臓のクッパー細胞に捕捉された像が認められた(Fig. 5)。3日後には脾臓の赤脾髄に赤芽球巣が多く認められ、髄外造血が亢進していることが解った。7日後にはHbVを貪食しているクッパー細胞は観察されなかったが、脾臓では、HbVを捕捉、貪食しているマクロファージがまだ存在した。14日後にはHbVは消失したが、Berlin blue染色では、14日後に脾臓でのみヘモジデリンが検出された。形

態学的な異常は確認されなかった。

Fig. 6に抗PEG抗体を用いる免疫染色の結果を示す。肝臓については、1日後からクッパー細胞に染色が見られ、3日後に最も強く見られたが、14日後には消失した。対照的に脾臓では、1日後には最もHbVが存在する筈であるが染色されず、3日後に僅かに認められ、7日後に最も強く染色されていた。このことから、PEG修飾されたHbVがマクロファージ内で分解される過程で遊離したPEGが抗体と反応をするようになることが考えられた。14日後には、脾臓にも染色部位は一切認められなかった。

D. 考 察

本研究で明らかになった重要な項目は、生存率や全身動態の14日間の結果から、リコンビナントアルブミンに分散させたHbVの蘇生液としての効果が脱血液と同等であったこと、また投与したHbVは細網内皮系に捕捉され代謝されると同時に、低下していたヘマトクリットが正常値にまで回復したことである。

出血性ショック状態に陥り、ラットは低血圧、過換気、乳酸値の上昇、血糖値の上昇、アシドーシスを観察した。血糖値の上昇は、肝臓におけるグリコーゲン分解が亢進したためであり、これは出血性ショック状態で圧受容体反射によってカテコールアミンが血中に大量に遊離したためである。HbV群とSAB群ともにこれらのパラメータは蘇生後1時間でほぼ完全に回復した。しかし、両群で24匹中4匹が6時間の麻酔期間中に死亡した。出血性ショックとその蘇生の一連の過程において、虚血状態、低酸素状態、そして再灌流傷害を生じる。過去の文献においても、人工酸素運搬体あるいは輸血による蘇生の後に血中酵素(AST, ALT, LDH)が上昇することが報告されている。従って、今回のHbV群、SAB群で見られた1日後の血中酵素の亢進は、同様の結果と言える。腎機能を反映するアミラーゼ、リパーゼ、腎機能を反映するCREA, UA, BUNには有意な差も認められたが、特に重要な変

化とは考えられなかった。

AST, ALT, LDHの上昇は蘇生法の手順について問題を提起する結果といえる。出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流傷害を伴う。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。この状態に対し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が発生する。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。IL-10およびTNF- α の僅かな上昇は、再灌流傷害に起因しているのかもしれない。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。ここに再灌流による酸素供給があると、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、人工酸素運搬体を用いる出血性ショックからの蘇生については、単なる酸素供給の観点のみならず、後続する障害についても考慮した対応が求められ、今後は、蘇生手順(循環血液量の回復を優先し、電解質の投与に続いて膠質、酸素運搬体の投与)、細胞保護作用を呈する一酸化炭素(CO)の同時投与、或はhypotensive resuscitationの検討も必要と考えられた。

肝臓は、投与HbVが捕捉分解を受ける主要な細網内皮系を含む臓器である。再灌流傷害により肝臓の処理能力に影響を来すことを危惧したが、組織病理学的検討の結果、クッパー細胞が貪食をしている像が確認され、7日後には消失していた。また、脾臓においては、大量のHbVが赤脾随のマクロファージに捕捉されていることが確認され、これは過去の健常ラットへの単回投与、反復投与、血液交換で得た結果と同様であった。米国Sangart社の報告によれば、PEG修飾Hbも脾臓に捕捉される(空胞形成が見られる)。従って、脾臓はHbVとPEG-Hbの共通の処理臓器として重要な臓器と言える。

安全性の項目として臓器への蓄積性が無いことの確認が重要である。我々の既報の研究では、HbV

の単回投与(20 ml/kg, [Hb] = 10 g/dL; 2g Hb/kg)および40%交換輸血(22.4 ml/kg i.v., [Hb] = 8.6 g/dL; 1.9 Hb/kg)において、HbVは7日以内に消失していた。しかし今回の出血性ショック蘇生試験では、7日後にもHbVの存在が確認され、14日後になって完全に消失していた。理由の一つとして、今回の投与量(28 mL/kg, [Hb] = 8.6 g/dL, 2.4 g Hb/kg)が従来よりも多いことが考えられるが、その他に、処理能力がショック後では低減すること、或はショックの場合はHbVの体内動態が正常とは異なる事が考えられる。体内動態の詳細については、熊本大学薬学部の小田切優樹先生のグループが検討中である。

HbV群において血中コレステロールが3日後に増大したが、これは細網内皮系に捕捉されたHbVが分解されると同時にHbVの脂質膜成分が血中に遊離した為と考えられる。以前の単回投与の実験では、このほかHDL-コレステロール、 β -lipoprotein、phospholipidの上昇も認められたが、今回の実験ではこれらの項目は上昇しなかった。蘇生後、生体は造血を含め回復と成長に栄養分を必要としており、HbVの構成成分が有効に利用されている可能性がある。HbV群において、血中ビリルビンとFe³⁺の上昇は認められなかったが、脾臓に顕著なヘモジデリン沈着が認められた。臨床においても、保存した赤血球の血中滞留時間が短いため、輸血を頻繁に受ける患者ではヘモジデリン沈着が認められる。これらの結果は、胆汁管に流路障壁や鬱滞が無く、HbVの分解とその排泄が生理的許容範囲内にあることを示している。

HbV粒子の表面はPEG脂質(PEG-DSPE)の導入によりPEG鎖で修飾されており、これによって保存中および投与後の血中において高い分散性を得ている。恐らくPEG-DSPEはマクロファージ内において、PEGとDSPEのアミド結合が加水分解を受け、PEG鎖が遊離し、最終的には腎糸球体を經由して排泄されるものと考えられる。HbVの全構成成分のうち、PEG鎖は僅か1 wt%である。これは米国で開発されているSangart社のPEG-HbのPEG含量(32 wt%, 6本