

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[†]

酒井 宏水¹⁾ 堀之内宏久²⁾ 山本 学²⁾ 池田 栄二³⁾ 武岡 真司⁴⁾
高折 益彦⁵⁾ 土田 英俊¹⁾ 小林 紘一²⁾

(背景) 輸血代替として開発されたヘモグロビン小胞体 (HbV, 粒径 $251 \pm 81\text{nm}$) について, 動物投与試験によりその酸素運搬機能が明らかにされてきた. しかし投与後の中長期的な回復過程, 特に細網内皮系における HbV の分解と造血については十分な検討が為されていなかった. (方法) Wistar 系ラット (♂, 60 匹) を用い, HbV を 5g/dL 濃度のリコンビナントアルブミン溶液 (rHSA) に分散させた溶液 (HbV/rHSA), ラット保存赤血球を rHSA に分散させた溶液 (sRBC/rHSA), 或は rHSA 溶液単独で, 循環血液量の 40% を急速交換した. その後最長 14 日間の血液学的, 血液生化学的解析, および組織病理学的検討を実施した. (結果) HbV/rHSA 群と rHSA 群では, 血液交換後に低下したヘマトクリット値 (Hct, 約 26%) が, 7 日後には交換前の値 (43%) にまで回復した. 血中エリスロポエチン濃度は, 全群で上昇した. 特に rHSA 群で 1 日後に最も高い値を示し ($321 \pm 123\text{IU/L}$), 貧血状態を反映したと考えられた (HbV/rHSA, 153 ± 22 ; sRBC/rHSA, 63 ± 7 ; baseline, 21 ± 3). また, 同時に全群で脾臓肥大を認めた (HbV/rHSA > rHSA > sRBC/rHSA). 組織病理学的観察から, 脾臓に捕捉された HbV は 14 日以内に完全に消失した. しかし, ヘモジデリン沈着が HbV/rHSA 群および sRBC/rHSA 群に認められた. また, rHSA 群と HbV/rHSA 群の赤脾髄に多量の赤芽球が存在した. (結論) 40% 交換輸血において, 脆弱な赤血球が細網内皮系で捕捉分解される生理的機序と同様の経路を経て, HbV が捕捉代謝される過程が予想された. また, 造血機能の亢進により Hct が 7 日以内に完全に支障無く回復することを確認した.

キーワード：人工血液, 人工酸素運搬体, 人工赤血球, リポソーム, 代用血漿剤

[†] 本論文内容は, Transfusion 誌編集長および Blackwell Publishing 社の許可のもと, Transfusion 第 46 巻 第 3 号 339 頁-347 頁, 2006 年に最初に掲載された論文に基づき作製したものである (This article is based on a study first reported in the paper: Sakai H, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Takaori M, Tsuchida E, Kobayashi K: Acute 40 percent exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles (HbV) suspended in recombinant human serum albumin solution: degradation of HbV and erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks. Transfusion. 46 (3): 339-347, 2006)

第 53 回日本輸血学会総会推薦論文

1. 緒 言

ヘモグロビン (Hb) を利用した人工酸素運搬体 (Hb-based O_2 carriers, HBOCs) の研究が世界的規模で進展し, 臨床試験の段階にある製剤も幾つか知られている¹⁾²⁾. HBOC の利点は, 血液型が無いこと, 病原体を完全に排除できること, また, 赤血球に比較して長期間の保存が可能なことである³⁾. 血中滞留時間が赤血球に比較して 2~3 日と短いものの⁴⁾, 様々な短時間の用途が期

待されている. 例えば, 1) 緊急時の出血性ショックの蘇生液として, 輸血までの繋ぎとしての投与⁵⁾, 2) 術前の血液希釈, 術中の出血に対する投与により, 輸血の回避, 或は輸血を遅らせる手段⁶⁾, 3) 心臓手術の際に使用する体外循環回路の補充液としての利用, 4) 酸素治療剤として, 虚血性疾患など局所的低酸素状態の改善薬としての利用, などがある⁸⁾⁹⁾.

筆者らが開発したヘモグロビン小胞体 (HbV) は,

- 1) 早稲田大学理工学研究所
- 2) 慶應義塾大学医学部外科
- 3) 慶應義塾大学医学部病理学科
- 4) 早稲田大学理工学術院
- 5) 東宝塚さとう病院

〔受付日：2006 年 10 月 5 日, 受理日：2006 年 12 月 12 日〕

期限切れ赤血球から精製した高純度高濃度ヒト Hb 溶液を脂質膜で被覆した微粒子構造をしている¹⁰⁾¹¹⁾。赤血球と類似の細胞構造により、本来毒性を有する分子状 Hb と血管内皮細胞との直接的接触の回避が可能となる¹²⁾¹³⁾。血中に投与された HbV は、酸素運搬機能を終えた後、最終的に細網内皮系 (RES, Reticuloendothelial system) マクロファージに捕捉、分解されることが負荷投与試験から明らかになっている^{14)~17)}。これまでに、HbV をヒト血漿由来のアルブミン或はリコンビナントアルブミン溶液 (rHSA) に分散させ、循環血液量の 80~90% を交換する極度の血液希釈試験、50% 脱血による出血性ショックモデルに対する蘇生試験等で、急性期において赤血球と同等の酸素運搬機能が実証されてきた^{18)~21)}。しかし、投与後数時間の観察に留まっており、中長期的な観察は充分になされていなかった。

そこで本研究では、HbV を rHSA 溶液に分散させた溶液を用い、臨床的に想定される 40% の血液交換をラットモデルを用いて行い、その後 2 週間に亘る観察を行った。血液生化学検査、血液学的検査、組織病理学的検査を行い、特に RES における HbV の代謝と Hct の回復過程について注目した。単回負荷投与、或は反復負荷投与の際には、肝臓よりも脾臓の肥大が顕著であり¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾、更に、老化赤血球は脾臓にて捕捉代謝されることが知られているので²²⁾、本研究では、輸血モデルとして保存赤血球を投与した場合も実施し、脾臓への影響を比較検討した。

2. 材料・方法

2-1. rHSA に分散させた HbV の調製

HbV は無菌的条件下にて、既報に従って調製した²³⁾²⁴⁾。精製ヒト Hb 溶液は、日本赤十字社から提供を受けた期限切れヒト赤血球より調製した。HbV は 38g/dL の Hb 溶液を内包している。アロステリック因子として pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を含有する (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, PLP : Hb = 2.5 : 1 by mol)。HbV の脂質膜には、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine, cholesterol, 1,5-O-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate (日本精化、大阪)、および 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-PEG₅₀₀₀ (日本油脂、東京) が、5/5/1/0.033 の割合で存在している。エンドトキシン含量は、リムルス法の変法により 0.1EU/mL 以下であることを確認した²⁵⁾。物理化学的パラメータとして、酸素親和度 (P_{50}) が 27Torr、粒径 251 ± 81 nm、metHb 含量は 3% 以下であった。HbV 分散液 ($[Hb] = 10\text{g/dL}$) 8.6mL を rHSA 溶液 (25g/dL) 1.4 mL と混合し、HbV が分散している外液の rHSA 濃度を 5g/dL に調節した。従って、得られた HbV/rHSA の Hb 濃度は $8.6\text{g/dL} = 10\text{g/dL} \times 8.6 / (8.6 + 1.4)$ にな

る。このとき膠質浸透圧は 20Torr、粘度 2.9cP になる。

2-2. rHSA に分散させたラット保存血の調製

エーテル麻酔下、Wistar 系ラットの下大静脈から急速脱血した。ラット血液 10mL に対し、血液保存液 (CPDA-1, 川澄化学社製) を 1mL 加え、密封して 4°C にて 1 週間冷蔵保存した。報告によれば、1 週間保存したラット赤血球の脆弱性は、ヒト赤血球を同条件で 4 週間保存したものと同等になる²⁶⁾。保存後、遠心分離 (4,000 g, 10min) して血清と白血球を除去し、再度生理食塩水を等量加えて遠心分離する操作を二回繰り返した。次いで 5g/dL の rHSA を添加して再分散させ、再度遠心分離して上澄みを除去し、rHSA を添加して Hb 濃度を 8.6g/dL に調節した (sRBC/rHSA)。

2-3. 血液交換試験と 2 週間の観察

Wistar 系ラット 65 匹を用いた (♂, $223 \pm 20\text{g}$)。ネンブタール (Abbot Laboratories, North Chicago, IL) を腹腔内投与し (1mL/kg) 麻酔状態とし、頸動脈にポリエチレン製カテーテル (SP31) を挿入した。1mL/30 sec の脱血と同量の試料溶液投与を繰り返して 40% の血液を交換した。試料溶液は、HbV/rHSA (HbV 群, $n=20$)、sRBC/rHSA (sRBC 群, $n=20$)、および rHSA 単独の投与 ($n=20$) である。ベースラインの値を知るため、5 匹のラットを使用した。

循環血液量は 56mL/kg 体重と推定し²⁷⁾、これを維持しながら血液を交換すると仮定し、実験に必要な HbV 分散液の量を計算した。1.0mL の脱血と試料等投与を繰り返したと仮定すると、40% の血液交換は次式で示される。

$$40\% = 100 \times \{1 - [(0.056 \times \text{体重} - 1.0) / (0.056 \times \text{体重})]\}^n \quad (1)$$

総投与量は、 $n \times 1.0$ (mL) と計算できる²⁸⁾。体重 220 g のラットの場合、必要量は 6.0mL になる。

血液交換終了後、カテーテルを外し、右頸動脈を結紮、切開部を縫合した。ラットはその後、ケージに入れ最長 14 日間生存させた。投与後 1, 3, 7, 14 日目に各群から 5 匹を選択し、1.5% セボフルレン吸入麻酔下、尾静脈より 24G-留置針 (ニプロ社製) を使用して採血 (150 μ L) し、ヘマトクリットと血球数測定を行った (Model KX-21, シスメックス, 神戸)。開腹して下大静脈から採血し、血液生化学検査の検体とした。その後直ちに臓器を摘出し、10% ホルマリン中性リン酸溶液に浸漬固定し、パラフィン包埋した。4 μ m 厚の切片について、ヘマトキシリン-エオジン (H/E) 染色、ベルリンブルー染色、および、ギムザ染色を実施した。

脱血液 (約 6mL) を遠心分離 (5,000g, 10 分) し、血漿を得た。HbV が血漿中に残存している場合 (1, 3 日後) には、更に超遠心分離 (50,000g, 20 分) によりこれを沈降分離し、透明な血漿層を測定検体とし、血

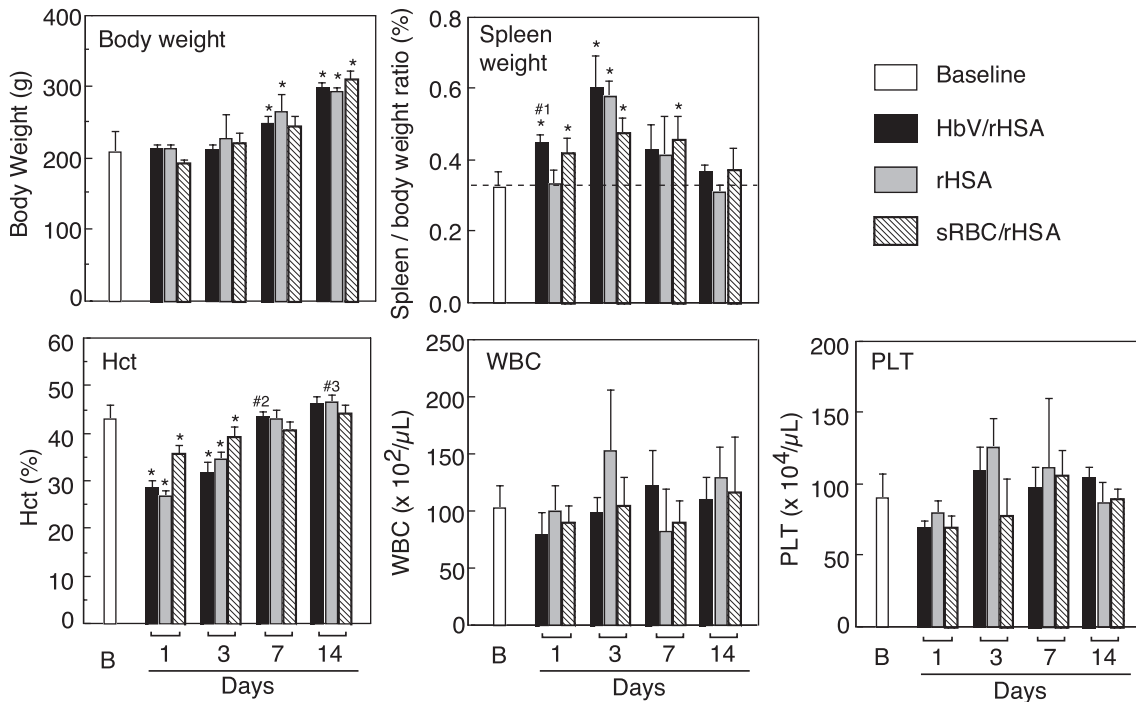


図1 40%血液交換後の体重, 脾臓重量比, および血球数の変化. * $p < 0.01$ vs baseline; #1 $p < 0.01$ vs. rHSA 群; #2 $p = 0.0288$ vs. sRBC/rHSA; #3, $p = 0.0353$ vs. sRBC/rHSA. B: baseline. (From: Sakai et al., Transfusion 2006; 46: 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

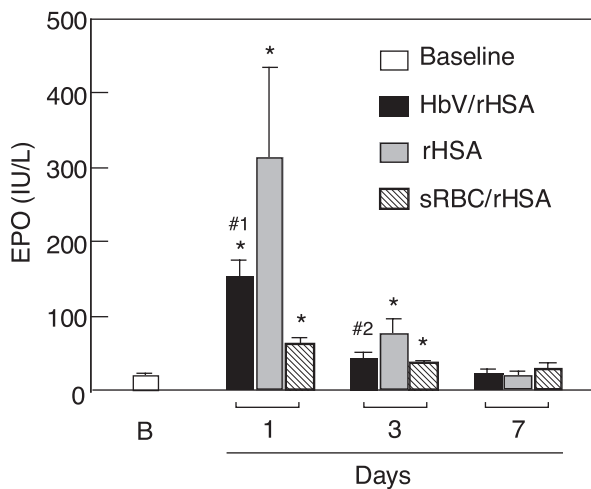


図2 40%血液交換後の血中エリスロポエチンの濃度変化. * $p < 0.01$ vs baseline; #1 $p = 0.0222$ vs. rHSA; #2, $p = 0.0195$ vs. rHSA. B: baseline. (From: Sakai et al., Transfusion 2006; 46: 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

液生化学検査における HbV の干渉作用を排除した²⁹⁾. 得られた透明な血漿には Hb が含まれず, HbV の溶血が無いことを示した. 血漿検体は検査まで -80°C にて凍結保存した. 測定項目は, 肝臓, 腎臓機能等を反映する通常の検査項目のほか, エリスロポエチン (EPO), および HbV の分解排泄を反映すると考えられる脂質成分と, ビリルビン, 遊離鉄等とした (BML 社). ラッ

トの EPO は, ヒトの EPO との相同性が高いので, 抗ヒト EPO 抗体での検出が可能であった³⁰⁾.

動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験委員会の承認を得て実施した. また, Guide for the Care and Use of Laboratory Animal の指針に従った³¹⁾.

2-4. 統計処理

結果は全て平均 \pm 標準偏差 (SD) として記した. コントロール群と処置群の間の有意差検定には, Fisher's protected least significance difference test および one way ANOVA 法を用いた. p 値が 0.01 以下のときに有意な差と判定した.

3. 結果

3-1. 体重, 脾臓重量, 血液学的検査の結果

全群が 40% 交換輸血に耐え, 犠牲死させるまで生存した. これは, 5g/dL の rHSA 溶液の使用により, 膠質浸透圧と循環血液量を一定に保ち乍ら血液希釈を行ったことが理由として先ず考えられる. 体重 (約 223g) は 14 日後には 300g 程度にまで成長した (図 1). 立毛などの異常な症状は認められなかった.

体重に対する脾臓重量の変化では, HbV/rHSA 群で特に, 1, 3 日後に有意に増大していたが, 14 日後には正常値に復した. rHSA 群では 1 日後には変化は無いが, 3 日後に急激に増大し, その後低下して 14 日後には正常値に復した. sRBC 群は HbV 群よりは程度は低いものの 1 日後から 7 日後まで脾臓肥大が見られた.

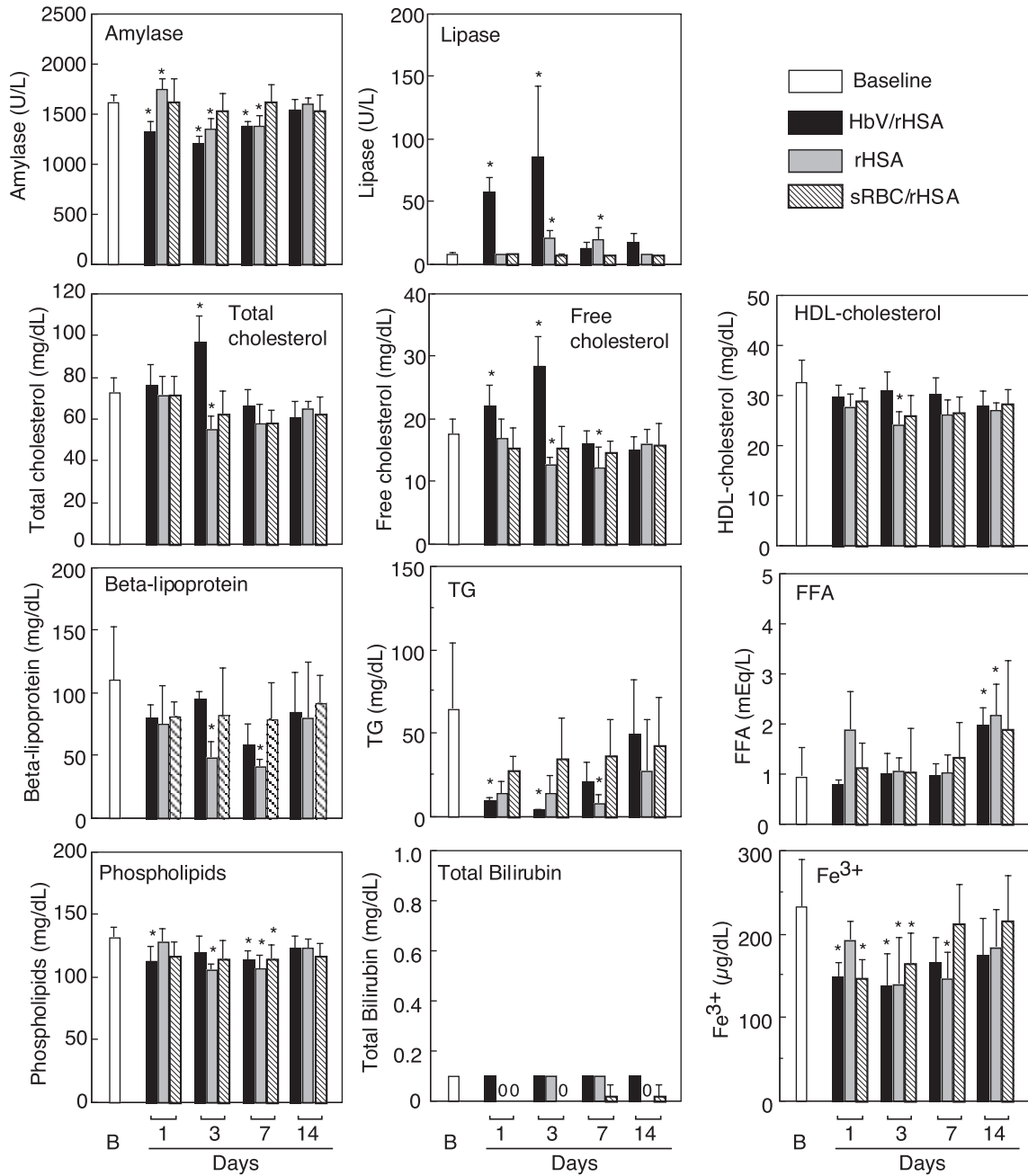


図3 40%血液交換後の血液生化学検査の結果。* $p < 0.01$ vs. baseline. Triglyceride, TG; free fatty acid, FFA; baseline, B. (From: Sakai et al., Transfusion 2006; 46: 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

Hct 値は、血液交換前は43%であったが、HbV/rHSA 群および rHSA 群は、血液交換後 Hct 値が26%に低下した。7日後には交換前の値(43%)に復し、更に14日後には46%になり、交換前の値を超えた。sRBC/rHSA 群では、投与後の値は高いが、7、14日後では他の二群に比較して低めの値を示した。平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)に異常を認めなかった。但し、HbV/rHSA 群では、1、3日後に血液中にHbVが残存しているため、測定不能であった。sRBC/rHSA 群では、1日後のMCHおよびMCHCで低下傾向がみ

られた。Hct 値とは対照的に、血小板数および白血球数は、安定した値を推移した。HbV由来の血漿中Hb濃度は、血液交換直後は4.4g/dLと想定され、その後、1、3、7日後に 1.8 ± 0.1 、 1.1 ± 0.1 、 $0g/dL$ に低下した。

3-2. 血液生化学検査

血中EPO値は、貧血、低酸素状態、ストレス等を反映する項目であり、血液交換前の $21 \pm 3IU/L$ が、1日後にrHSA群が $321 \pm 123IU/L$ を示し、これはHbV/rHSA 群(153 ± 22)、sRBC/rHSA 群(63 ± 7)よりも高値であった(図2)。しかし3日目には低下傾向にあり、7日後には処置前の値に復した。

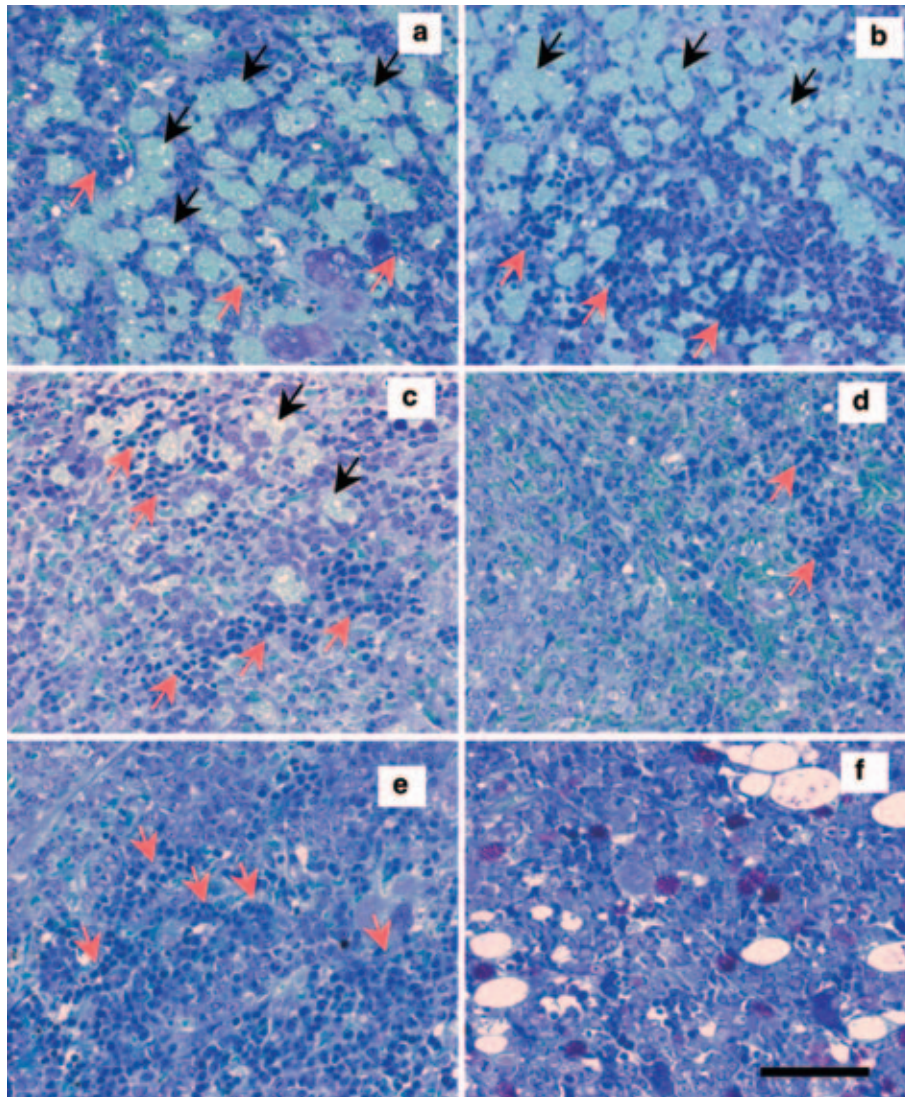


図4 HbV/rHSA 群および rHSA 群の組織切片のギムザ染色像。(a), (b), (c) は, HbV/rHSA 群の 1, 3, 7 日後の脾臓。捕捉された HbV は薄青色の領域 (黒矢印)。赤芽球巣は濃青色の細胞として確認される (赤矢印)。HbV は 7 日後には可成り減少する。(d) HbV/rHSA 群の 14 日後の脾臓。HbV は完全に消失した。(e) rHSA 群の 3 日目の脾臓。赤芽球巣が多く認められる。(f) HbV/rHSA 群の 3 日目の骨髄にも濃青色の赤芽球が存在する。紫のスポットが点在する細胞は好塩基球と考えられる。スケールバーは 50 μ m。(From : Sakai et al., Transfusion 2006 : 46 : 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

その他, AST 値が 1 日目に若干の上昇傾向を示したが (HbV/rHSA, 70 ± 5 U/L ; rHSA, 69 ± 12 ; sRBC/rHSA, 72 ± 9 ; 正常値, 60 ± 7), 3 日後には正常値に復した。ALT 値は特に変化は無かった。ALP および γ -GTP には多少の変動があった。CPK は安定していた。全群について, クレアチニン, 尿酸は低値傾向を示した。アミラーゼに低下傾向が見られたが (図 3), HbV/rHSA 群のみ, リパーゼの上昇を認めたが, 7 日後には正常値に復した。脂質成分濃度については, HbV/rHSA 群で血中の総コレステロール, 遊離コレステロールの亢進が 3 日後に見られたが, 7 日後には正常値に復した。 β -リポ蛋白, 高密度リポ蛋白コレステロールは, 血液交

換後に特に rHSA 群で低下傾向があった。トリグリセリドも全群で低下傾向にあり, 特に HbV/rHSA 群で 1, 3 日後に顕著であった。これは, 血漿を超遠心分離した際に分離されたことも一因と考えられた。リン脂質は全群で僅かに低下傾向にあった。遊離脂肪酸は 14 日後に増加傾向にあった。ビリルビン濃度 (<0.1mg/dL) は常に低値を推移した。遊離鉄濃度は低下傾向にあったが, 14 日後には血液交換前の値に復した。

3-3. 組織病理学的検討

全群において肺, 心臓, 腎臓等に著変を認めなかった。HbV/rHSA 群では 1, 3 日後に肝臓のクッパー細胞, 骨髄のマクロファージに捕捉された HbV が観察された

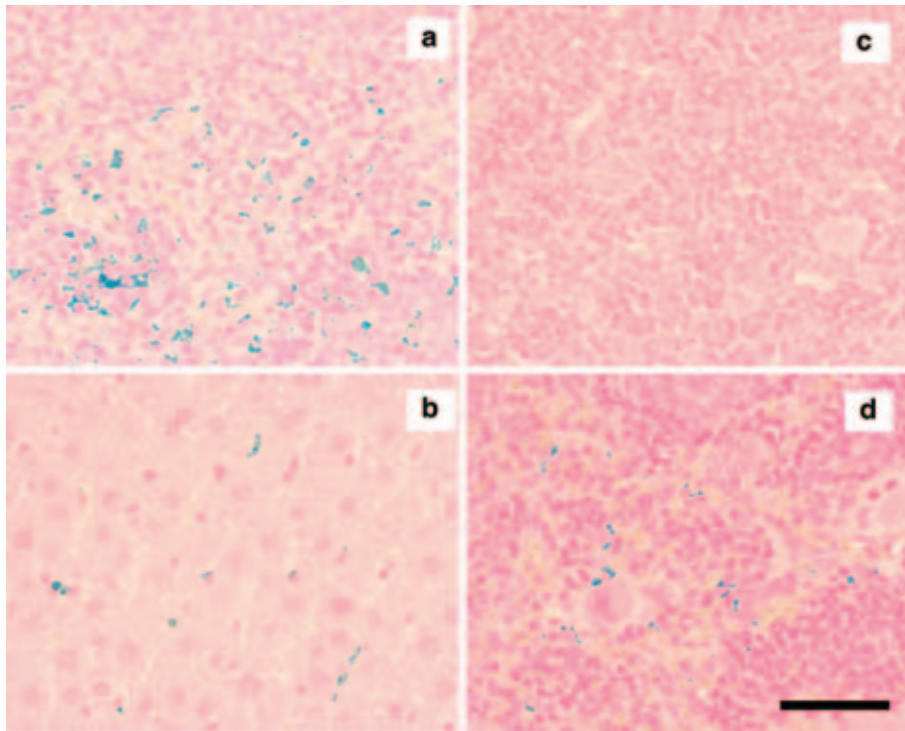


図5 HbV/rHSA 群および sRBC/rHSA 群の 14 日後の組織切片のベルリンブルー染色像。
HbV/rHSA 群の (a) 脾臓, (b) 肝臓, および (c) 骨髄. 脾臓と肝臓にヘモジデリンが存在した。(d) sRBC/rHSA 群の脾臓にもヘモジデリンが検出された. スケールバーは 50 μ m.
(From : Sakai et al., Transfusion 2006 ; 46 : 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

が次第に減少し、14 日後には消失した。HbV/rHSA 群では 3 日後に血中リパーゼの上昇が認められたが、脾臓に著変は認められなかった。HbV/rHSA 群の脾臓のギムザ染色では、1, 3 日後に赤脾髄に捕捉された HbV が多く認められた。しかし 7 日後には減少し、14 日後には消失していた (図 4)。実験期間を通して脾索に赤芽球および前赤芽球の巣 (集合) が多く存在し、特に 3, 7 日後で顕著であった。巣の形成から、活発な髄外造血が伺えた。rHSA 群でも 3 日目に赤芽球巣を多く認めた。骨髄での造血も HbV/rHSA 群で確認された。ベルリンブルー染色により、HbV/rHSA 群で 7 日後に脾臓にヘモジデリンが僅かに観測され、14 日後に更に顕著になった (図 5)。僅かに肝臓のクッパー細胞にも認められたが、骨髄には無かった。sRBC/rHSA 群では、14 日後に脾臓にヘモジデリン沈着が観測された。

4. 考 察

本研究における重要な点は、HbV/rHSA 溶液により 40% 血液交換されて低下した Hct 値が、7 日後には完全に回復したこと、また、14 日までに RES に捕捉された HbV がほぼ消失したことである。HbV 群の脾臓肥大は、赤脾髄への HbV の捕捉と、EPO 分泌に反応して強い造血作用により赤芽球巣が脾索に多く存在する事に起因すると考えられた。しかし脾臓重量は 14 日後には

完全に回復していた。

これまでの放射化ラベルした HbV の体内動態の研究から、HbV は最終的に RES に移行することが解っている¹¹⁾¹⁶⁾。脾臓肥大の一因は、図 4 から解るように、HbV が赤脾髄に捕捉されることであるが、14 日後には消失する。投与 3 日後までの血中コレステロールの緩やかな上昇、また HbV が血中では分解しない事実から、HbV が RES のマクロファージの食胞で捕捉分解されてからコレステロールが血中に遊離したものと考えられた¹⁴⁾¹⁵⁾。既報の HbV 負荷投与試験の結果では、高密度リポ蛋白コレステロール、 β リポ蛋白、リン脂質の増大が、過剰量として血中に確認された¹⁵⁾¹⁷⁾。しかし、今回の 40% 交換輸血試験では、それらの上昇が見られず、むしろ低下する傾向もあった。従って大量の血液が HbV/rHSA で置換された場合には、HbV の脂質成分が体内で有効利用され、造血や成長に使用された可能性がある。

HbV が大量に投与され、その分解過程でヘム鉄やポルフィリンの分解物であるビリルビンが大量に遊離することを懸念したが、血中濃度の上昇は 14 日間全く見られなかった。Hb から放出されたヘムは、肝臓クッパー細胞や、脾臓マクロファージの誘導型ヘムオキシゲナーゼ-1 の酵素分解を受け、ビリルビンに変化する¹⁵⁾³²⁾。今回の実験から、HbV の大量投与に際してもビリルビンは通常の経路によって分解され、胆汁となって排泄さ

れること、また胆汁管排泄機能に影響が無いことが考えられた。ベルリンブルー染色では、14日後の肝臓と脾臓にヘモジデリン沈着が認められた。通常、ヘム由来の鉄はフェリチンとして蓄えられるが³³⁾、鉄含量が多くなるとヘモジデリンになる。フェリチンもヘモジデリンも鉄イオンを遊離し、過酸化水素とのフェントン反応によりOHラジカルを産生し、これが脂質過酸化を助長する懸念がある³⁴⁾。しかし化学的には、不溶化沈着したヘモジデリンの方がフェリチンよりも不活性であるとの見方もある³⁵⁾。一般的に輸血を頻回受ける患者では、保存赤血球の血中半減期が短いためRESに捕捉され、ヘモジデリンが多く認められる。本研究では、sRBC群でも緩慢ではあるが脾臓肥大とヘモジデリン沈着が認められた。保存血では老化赤血球のように赤血球の変形能が低下し脆弱となり、血中滞留時間が短くなり脾臓で捕捉、分解されることも原因の一つと考えられる³⁶⁾。これらのことから、HbV由来のヘムの分解および鉄の貯蔵は、生理的許容範囲内であり、脆弱な保存赤血球の場合と同様の良く知られた生理的経路により行われていることが予想できた³⁶⁾。

興味深い事に、脾臓肥大はHbV/rHSA群およびsRBC/rHSA群だけでなく、rHSA群で3日目に顕著であった。文献によると、ラットは低酸素状態に曝されると、髄外造血が脾臓で顕著になる³⁷⁾³⁸⁾。我々の実験では、rHSA群で特に3日目に大量の赤芽球巣の存在を見出している。¹²⁵I-rHSAの体内動態に関する文献から³⁹⁾⁴⁰⁾、rHSAが異種蛋白質として脾臓に特異的に捕捉される可能性は低く、脾臓肥大との関係も無いと考えられる。従ってrHSA群の脾臓肥大は、EPO分泌にによって髄外造血が活性化された為と考えられた。

腎臓から分泌されるEPOは、貧血の状態を強く反映する⁴¹⁾⁴²⁾。rHSA群で投与1日後に最も高いEPO値を示し、酸素運搬量の低下により貧血状態が最も強かったことが伺える。次いでHbV/rHSA群が高値を示した。これはHbVの血中半減期が短い事と、酸素運搬機能の無いmetHbの含量が増大することに起因している⁴³⁾。また、sRBC/rHSA群でも血液交換後にHctが低下しているため、EPO値の緩慢な上昇が確認された。従って、HbV/rHSA群およびsRBC/rHSA群の脾臓肥大のもう一つの要因として、造血過程における赤芽球巣の存在が考えられる。興味深い事に、rHSA群、HbV/rHSA群の14日後のHct値は46%となり、sRBC群の値(43%)を上回っていた。これはEPO分泌量が rHSA群、HbV群がsRBC群よりも高く、造血が亢進されたため overshootingしたのかもしれない。MCH、MCV、MCHCが正常であったことも、造血作用に異常が無いことを支持している。

血液生化学検査では、HbVが大量に肝臓クッパー細胞に移行するにも関わらず、特に肝機能に影響が無いことを示唆した。HbVの投与によってリパーゼの上昇が既報の負荷投与試験も含め常に認められている。これは、HbVの成分である脂質によって、リパーゼの分泌が亢進したのかもしれない¹⁵⁾¹⁷⁾⁴⁴⁾。

結論として、臨床でのHbVの使用を想定したラットへの投与試験(40%血液交換)に際し、ラットは全例が生存し、血液希釈により低下したHctは7日以内に回復した。一過性の脾臓肥大とヘモジデリン沈着が確認されたが、余剰な鉄イオンの遊離は認められなかった。HbVは脆弱な保存赤血球の場合と同様の生理的経路により、細網内皮系で捕捉代謝され、構成成分が支障無く排泄或は再利用される過程が予想された。まだ不明の点もあるが、HbVを輸血代替として使用する場合の安全性についての知見を得ることができた。

謝辞：試料調製を担当した宗慶太郎助教授、政田洋平氏(早稲田大学)、組織病理学的検討に際し染色を担当した阿部仁氏(慶應義塾大学医学部病理学教室)、また有益なご助言を頂きました末松誠教授(慶應義塾大学医学部医化学)、ならびに村田満教授(慶應義塾大学医学部臨床検査医学)に感謝申し上げます。リコンビナントアルブミンはニプロ社より提供を受けた。本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金(医薬品・臨床機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業)、日本学術振興会 科学研究費補助金(B16300162)、日本人工臓器学会 JSAO-Grantにより推進された。また、(株)オキシジェニックスの支援を受けた。記して謝意を表す。

文 献

- 1) Chang TMS: Hemoglobin based red blood cells substitutes. *Artif Organs*, 28: 789—794, 2004.
- 2) Buehler PW, Alayash AI: Toxicities of hemoglobin solutions: in search of in-vitro and in-vivo model systems. *Transfusion*, 44: 1516—1530, 2004.
- 3) Sakai H, Tomiyama K, Sou K, et al: Polyethyleneglycol-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjugate Chem*, 11: 425—432, 2000.
- 4) Lee R, Neya K, Svizzero TA, et al: Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J Appl Physiol*, 79: 236—242, 1995.
- 5) Johnson JL, Moore EE, Offner PJ, et al: Resuscitation with a blood substitute abrogates pathologic postinjury neutrophil cytotoxic function. *J Trauma*, 50: 449—456, 2001.
- 6) Standl T, Burmeister MA, Horn EP, et al: Bovine

- haemoglobin-based oxygen carrier for patients undergoing haemodilution before liver section. *Brit J Anesth*, 80: 189—194, 1998.
- 7) York GB, DiGeronimo RJ, Wilson BJ, et al: Extracorporeal membrane oxygenation in piglets using a polymerized bovine hemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC-201). *J Pediatr Surg*, 37: 1387—1392, 2002.
 - 8) Contaldo C, Plock J, Sakai H, et al: Hemodilution with polymerized and encapsulated hemoglobins improves oxidative energy metabolism in collateralized hamster flap tissue. *Crit Care Med*, 33: 806—812, 2005.
 - 9) Nozue M, Lee I, Manning JM, et al: Oxygenation in tumors by modified hemoglobins. *J Surg Oncol*, 62: 109—114, 1996.
 - 10) Djordjevich L, Mayoral J, Miller IF, et al: Cardiorespiratory effects of exchanging transfusions with synthetic erythrocytes in rats. *Crit Care Med*, 15: 318—323, 1987.
 - 11) Awasthi VD, Garcia D, Klipper R, et al: Neutral and anionic liposome-encapsulated hemoglobin: effect of postinserted poly (ethylene glycol)-distearoyl-phosphatidylethanolamine on distribution and circulation kinetics. *J Pharmacol Exp Ther*, 309: 241—248, 2004.
 - 12) D'Agnillo F, Alayash AI: Redox cycling of diaspirin cross-linked hemoglobin induces G2/M arrest and apoptosis in cultured endothelial cells. *Blood*, 98: 3315—3323, 2001.
 - 13) Sakai H, Hara H, Yuasa M, et al: Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension in conscious hamster model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: H908—H915, 2000.
 - 14) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, et al: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in metabolism. *Am J Pathol*, 159: 1079—1088, 2001.
 - 15) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, et al: Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J Pharmacol Exp Ther*, 311: 874—884, 2004.
 - 16) Sou K, Klipper R, Goins B, et al: WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther*, 312: 702—709, 2005.
 - 17) Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, et al: Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials*, 25: 4317—4325, 2004.
 - 18) Cabrales P, Sakai H, Tsai AG, et al: Oxygen transport by low and normal oxygen affinity hemoglobin vesicles in extreme hemodilution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H1885—H1892, 2005.
 - 19) Yoshizu A, Izumi Y, Park S, et al: Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicle, maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor-alpha. *ASAIO J*, 50: 458—463, 2004.
 - 20) Sakai H, Takeoka S, Park SI, et al: Surface-modification of hemoglobin vesicles with polyethyleneglycol and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90%-exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem*, 8: 15—22, 1997.
 - 21) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, et al: Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit Care Med*, 32: 539—545, 2004.
 - 22) Landaw SA: Factors that accelerate or retard red blood cell senescence. *Blood Cells*, 14: 47—59, 1988.
 - 23) Sou K, Endo T, Naito Y, et al: Efficient up-scale production of hemoglobin-vesicles (HbV) using the freeze-thawing and rapid extrusion. *Biotechnol Progr*, 19: 1547—1552, 2003.
 - 24) Sakai H, Yuasa M, Onuma H, et al: Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem*, 11: 56—64, 2000.
 - 25) Sakai H, Hisamoto S, Fukutomi I, et al: Detection of Lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by Limulus amoebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment with a surfactant. *J Pharm Sci*, 93: 310—321, 2004.
 - 26) d'Almeida MS, Jagger J, Duggan M, et al: A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion. *Transfus Med*, 10: 291—303, 2000.
 - 27) Izumi Y, Sakai H, Hamada K, et al: Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension. *Crit Care Med*, 24: 1869—1873, 1996.
 - 28) Sakai H, Tsai AG, Kerger H, et al: Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res*,

- 40: 66—78, 1998.
- 29) Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, et al: Pretreatment of serum containing Hb-vesicles (oxygen carriers) to avoid interference in clinical laboratory tests. *Clin Chem Lab Med*, 41: 222—231, 2003.
- 30) Wen D, Boissel JP, Tracy TE, et al: Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood*, 82: 1507—1516, 1993.
- 31) Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, et al: Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 141: 528—533, 1986.
- 32) Finch CA, Huebers H: Perspectives in iron metabolism. *New Engl J Med*, 306: 1520—1528, 1982.
- 33) Grady JK, Chen Y, Chasteen ND, et al: Hydroxyl radical production during oxidative deposition of iron in ferritin. *J Biol Chem*, 264: 20224—20229, 1989.
- 34) O'Connell MJ, Ward RJ, Baum H, et al: Iron release from haemosiderin and ferritin by therapeutic and physiological chelators. *Biochem J*, 260: 903—907, 1989.
- 35) Bennett GD, Kay MM: Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Exp Hematol*, 9: 297—307, 1981.
- 36) Ou LC, Kim D, Layton WM Jr., et al: Splenic erythropoiesis in polycythemic response of the rat to high-altitude exposure. *J Appl Physiol*, 48: 857—861, 1980.
- 37) Stutte HJ, Sakuma T, Falk S, et al: Splenic erythropoiesis in rats under hypoxic and post-hypoxic conditions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 409: 251—261, 1986.
- 38) Okano K, Sogame Y, Ohkubo M, et al: Metabolic fate of recombinant human serum albumin (rHSA) (2). *Jpn Pharmacol Ther (Yakuri tou Chiryu)*, 25 (Suppl): 2007—2018, 1987.
- 39) Baynes JW, Thorpe S: Identification of the sites of albumin catabolism in the rat. *Arch Biochem Biophys*, 206: 372—379, 1981.
- 40) Eckardt KU, Koury ST, Tan CC, et al: Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia. *Kidney Int*, 43: 815—823, 1993.
- 41) Hughes GS Jr, DeSmith VL, Locker PK, et al: Phlebotomy of 500 or 750 milliliters of whole blood followed by isovolemic hemodilution or autologous transfusion yields similar hemodynamic, hematologic, and biochemical effects. *J Lab Clin Med*, 123: 290—298, 1994.
- 42) Teramura Y, Kanazawa H, Sakai H, et al: Prolonged oxygen-carrying ability of hemoglobin vesicles by encapsulation of catalase in vivo. *Bioconjugate Chem*, 14: 1171—1176, 2003.
- 43) Stuecklin-Utsch A, Hasan C, Bode U, et al: Pancreatic toxicity after liposomal amphotericin B. *Mycoses*, 45: 170—173, 2002.

ACUTE 40 PERCENT EXCHANGE-TRANSFUSION WITH HEMOGLOBIN-VESICLES (HBV) SUSPENDED IN RECOMBINANT HUMAN SERUM ALBUMIN SOLUTION: DEGRADATION OF HBV AND ERYTHROPOIESIS IN A RAT SPLEEN FOR 2 WEEKS

*Hiromi Sakai*¹⁾, *Hirohisa Horinouchi*²⁾, *Manabu Yamamoto*²⁾, *Eiji Ikeda*³⁾, *Shinji Takeoka*⁴⁾, *Masuhiko Takaori*⁵⁾, *Eishun Tsuchida*¹⁾ and *Koichi Kobayashi*²⁾

¹⁾Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

²⁾Department of Surgery, School of Medicine, Keio University

³⁾Department of Pathology, School of Medicine, Keio University

⁴⁾Faculty of Science and Engineering, Waseda University

⁵⁾East Takarazuka Sato Hospital

Keywords:

Artificial Blood, Artificial Oxygen Carriers, Artificial Red Cells, Liposome, Plasma Substitutes