

# 人工血液

第6巻 第2号 1998年6月

- 総説 ヘモグロビン系酸素運搬体による血管反応 ..... 仲井邦彦 25  
Blood Program and the Possibility of Applying Red Cell  
Substitutes in Indonesia ..... メラニー・ウィカント 37

- 原著 炭酸ガスによりpHを制御したヘモグロビン小胞体のヘモグロビン  
酸化挙動 ..... 朴晟翼 42

## 海外文献紹介

- Clinical Utility of Human Polymerized Hemoglobin as a Blood  
Substitute after Acute Trauma and Urgent Surgery ... 渡辺真純 46

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 6 No. 2 June, 1998

- Review: Vascular Effects of Hemoglobin-based Oxygen Carriers*  
..... Kunihiko Nakai 25  
*Blood Program and the Possibility of Applying Red Cell  
Substitutes in Indonesia* ..... Melani Wikanta 37

## Original Article:

- pH-control of Hemoglobin Solution by CO<sub>2</sub> Gas and Hemoglobin  
Oxidation of Hemoglobin Vesicles* ..... Sung Ick Park 42

- Topics: Clinical Utility of Human Polymerized Hemoglobin as a Blood  
Substitute after Acute Trauma and Urgent Surgery*  
..... Masazumi Watanabe 46

# 第5回日本血液代替物学会年次大会

## テーマ「人工血液、輸血のリスクをなくするために」

I 会期：1998年9月4日（金）・5日（土）

II 会場：かでる2・7 〒060-0002 札幌市中央区北2条西7丁目1番地  
Tel: 011-231-4111  
Fax: 011-271-9827

### III プログラム（演題名は仮題も含む）

大会長講演：輸血代替療法により血液事業は変わるか  
(関口定美／北海道赤十字血液センター)

特別講演：Clinical implications of blood substitutes (A. Gerson Greenburg/Brown Univ, USA)  
特別講演：全合成酸素輸液開発の現状と課題（土田英俊／早稲田大学理工学総合研究センター）  
特別講演：血小板の止血機構および代替物の可能性（池田康夫／慶應義塾大学医学部）  
教育講演：プリオント病と予防対策（田代邦雄／北海道大学医学部）  
教育講演：輸血感染症に残された課題『Residual riskとsatisfactory margin of safety』  
(西岡久壽彌／日本赤十字社技術顧問)

### シンポジウムⅠ：血液代替物開発のポイント

- (1) ヘモグロビン溶液のウイルス不活化（阿部英樹／北海道赤十字血液センター）
- (2) 人工赤血球の保有する諸機能（西出宏之／早稲田大学理工学部）
- (3) 活性酸素障害とその対策（藤井順逸／大阪大学医学部）
- (4) 微小循環動態の観測による赤血球代替物評価  
(酒井宏水／早稲田大学理工学総合研究センター)
- (5) Biocompatibility assessment of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb)  
(Kenneth E Burhop/Baxter Healthcare, USA)
- (6) 前臨床試験でクリアすべき課題（高折益彦／川崎医科大学）
- (7) 人工血小板の開発と課題（村田 満／慶應義塾大学医学部）

### シンポジウムⅡ：血液代替物の臨床応用に向けて

- (1) Oxygen carrying therapeuticsかreplacementか（小林紘一／慶應義塾大学医学部）
- (2) 代用赤血球が期待される病態（阿岸鉄三／東京女子医科大学）
- (3) 輸血のトリガー（清水 勝／東京女子医科大学）
- (4) 造血サイトカインにより同種血輸血は回避できるか（別所正美／埼玉医科大学）
- (5) 体外造血系の可能性：血小板代替物を目指した巨核球の大量培養の試み  
(平山文也／北海道赤十字血液センター)
- (6) 無細胞型ヘモグロビンによる肝微少血管収縮反応の増強効果：COおよびNOの役割  
(末松 誠／慶應義塾大学医学部)

# ヘモグロビン系酸素運搬体による血管反応

## Vascular Effects of Hemoglobin-based Oxygen Carriers

仲井 邦彦<sup>1)</sup>, 佐久間 一郎<sup>2)</sup>, 北畠 顕<sup>2)</sup>

Kunihiro Nakai<sup>1)</sup>, Ichiro Sakuma<sup>2)</sup>, Akira Kitabatake<sup>2)</sup>

ヘモグロビン(Hb)系酸素運搬体により、血圧上昇や消化管運動機能異常など種々の副作用が惹起されることが明らかとなった。この背景にはHbによるnitric oxide(NO)の不活性化があるものと予想される。我々は一連の実験から、分子量の小さなHb修飾体が血管外に漏出し、血管外でNOを不活性化し強力な血管収縮活性を示すと考えている。これまでに文献で報告されているその他の血管収縮因子の候補についてまとめるとともに、Hb系酸素運搬体の安全性について考察する。

Acellular hemoglobin (Hb)-based oxygen carriers (HBOCs) have been shown to induce several undesired reactions such as hypertension and motor dysfunctions of digestive tracts. Hb-induced scavenging of nitric oxides might be responsible for the backgrounds of these reactions. Based on several in vitro experiments, we propose a hypothesis that acellular Hb derivatives having smaller molecular masses have increased endothelial permeabilities and therefore induce more potent vasoconstriction as a result of abluminal nitric oxide scavenging. We also review other possible factors responsible for Hb-induced hypertensive reaction. More detailed understanding of the underlying mechanism(s) of these undesired reactions is essential to ensure the safety of HBOCs.

### 1. はじめに

Hbは赤血球内に高濃度(5 mM)で存在し、酸素運搬を主に担当する。このHbを赤血球より抽出後、種々の修飾を施し酸素運搬体として応用する試みがセルフリーHb系酸素運搬体(Hb-Based Oxygen Carrier: HBOC)である。この分野では米国の研究開発が進んでおり<sup>1,2)</sup>、1989年Northfield社による第1相臨床試験を皮切りに数多くの臨床研究が行われている(最近の動向については文献<sup>3,4)</sup>および日経バイオWWW(Table 1)が参考になる)。しかし、その一

方でHb系酸素運搬体により心血管反応、腎反応などが惹起されることも明らかとなり、その機序の解明と意義づけが待たれている<sup>5)</sup>。本稿ではHbによる血管反応について、我々のデータとともに研究状況を概説し、今後の課題を整理したい。なお、酸素運搬体全般<sup>6)</sup>およびpolyethylene glycol(PEG)修飾Hb(味の素安定化Hb)による心血管反応<sup>7)</sup>については既に本誌からそれぞれ詳しい総説が出されている。

Table 1 Recent news of cell-free Hb derivatives appeared in Nikkei Biotech WWW

Apex Bioscience社	97/3/19	PHP(味の素PEG修飾Hb)を用いた敗血症患者における急性低血圧を対象としたフェーズI/IIに成功。
Eli Lilly社	97/3/2	Somatogen社「rHb1.1」による外科手術での臨床試験を中止。
Northfield Laboratories社	97/4/2	成人血液量の60%に相当する重合Hb「PolyHeme™」を無作為投与するフェーズIII認可をFDAより取得。
Somatogen社	97/4/29	「Optro®」(rHb1.1)による心臓バイパス手術フェーズII開始。
Baxter Healthcare社	97/5/6	心臓バイパス手術における同種血輸血の回避を適応として、分子内架橋型Hb「HemAssist™」商業化認可を欧州医薬品庁に申請*。
Biopure社	98/2/2	獣医向け製剤「Oxyglobin」の動物医薬品承認を取得。人工酸素運搬体として世界初。イヌ貧血治療が適応。
Baxter Healthcare社	98/2/25	Somatogen社を買収、人工血液事業を強化。

日経バイオテク : <http://biotech.nikkeibp.co.jp/BIO.shtml>より転載。

\* 97/12現在、審査は例数不足で休止。Baxter社は98年中に再申請の意向。

1)東北大学大学院医学系研究科環境保健医学分野, Environmental Health Sciences, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2)北海道大学大学院医学系研究科循環器内科学, Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University School of Medicine.

東北大学大学院医学系研究科環境保健医学分野, 〒980-8575 仙台市青葉区星稜町2-1, Environmental Health Sciences, Tohoku University Graduate School of Medicine, Seiryō-cho 2-1, Aoba-ku, Sendai, 980-8575, Japan.

## 2. セルフリーへモグロビン：歴史的背景

### 2.1. セルフリーへモグロビンの起源

赤血球輸血の代替としてセルフリーHb溶液を用いる試みは新しいものではない<sup>8)</sup>。1868年Naunyn<sup>9)</sup>は2mLの溶血液を実験動物へ輸注し、急性DIC、心停止を報告したが、これがHb溶液投与の最初の記録とされている<sup>10)</sup>。ヒト投与例では、1898年Von Stark<sup>11)</sup>によるウマHb溶液を用いた貧血治療の試みがある。その後、赤血球溶血時に生ずる膜断片であるstromaが副作用の原因と認識され、1916年SellardsとMinot<sup>12)</sup>がstroma部分除去Hb溶液による初めてのヒト投与実験を行った。

赤血球外セルフリーHbの有効性について、酸素運搬能を最初に証明したのは、1934年Ambersonら<sup>13)</sup>のネコへのウシHb溶液輸液実験である。ウシHbは低酸素親和性Hbであり、クロロイオンがアロステリック因子として働き<sup>14)</sup>、未修飾Hbの状態で十分な酸素運搬能を示す。ネコ、ヒツジ、ヤギ、シカHbも同じく低酸素親和性Hbに属す<sup>15)</sup>。一方、ヒトHbに代表される高酸素親和性Hbはアロステリック因子として2,3-diphosphoglycerate(DPG)を要求し、DPG非存在下では酸素解離せずpyridoxalationなどによる酸素親和性制御が必要である<sup>16)</sup>。高酸素親和性Hbには齧歯類、イヌ、ブタ、ウマ、多くの靈長類Hbが含まれる。

一方、安全性、生体適合性については1960年代に大きな節目を迎えるが、その当時の主要な関心は、腎毒性、DIC、心血管反応である<sup>17)</sup>。DICに関わる血管内血液凝固はstromaが原因とされ、1967年Rabinerら<sup>18)</sup>がstroma除去法を改善してStroma-Free Hemoglobin(SFH)を確立しほぼ解決したとされる。腎毒性は未修飾Hbの腎糸球体からの排泄と尿細管再吸収と密接と考えられ、1969年Bunnら<sup>19)</sup>がHbに分子内架橋を導入し腎からの排泄が回避できることを示し、今日のセルフリーHb修飾体の原型が確立された。しかし、Hb溶液による心血管反応は未だ顕著であり、最近は腎反応<sup>5)</sup>、消化器反応<sup>20)</sup>が見られることも報告され、Hb修飾体の安全性は未解決の課題として認識されている<sup>21)</sup>。このような生体反応が微量の残存stromaなど非Hb因子に起因するものなのか、Hbそのものによるものなのか、未だに結論は得られていない<sup>11)</sup>。

セルフリーHbは進化の上で先例が見られ、脈管系が未発達な無脊椎動物の一部は高分子Hb様蛋白質を酸素貯蔵体として有し、ミミズは酸素運搬体として分子量340万のerythrocytinsを持ち、カタツムリは800万の巨大分子を利用する<sup>22)</sup>。一方、脊椎動物は酸素運搬体として細胞性Hb(赤血球)を利用する。1922年Barcroft<sup>23)</sup>はHbが赤血球に封入されている必然性として、コロイド浸透圧および粘性軽減、尿とリンパへのHb漏出回避、細胞内pHや有機リン酸など化学的環境維持、の三点を強調している。後述するように、セルフリーHbによる生体反応の多くはまさに非細胞性そのものと密接であり、セルフリーHb修飾体の研究は進化過程で細胞性へと変化したHbについて、再び非細胞性の可能性を問うものと指摘されている所以でもある<sup>5)</sup>。

### 2.2. 心血管反応に関する記述

文献的には溶血液もしくは粗精製Hb溶液による血管収縮が1920年Bayliss<sup>24)</sup>および1927年PhemisterとHandy<sup>25)</sup>によって初めて報告されている。1934年Ambersonら<sup>13)</sup>は低血圧期を経て昇圧に到

ることを示し、次いで1949年戦時にトルエン抽出法により作成したウシHb溶液を14名の患者に投与、顕著な血圧上昇と心拍数低下を報告した<sup>26)</sup>。1951年MillerとMcDonald<sup>27)</sup>はHb溶液投与後に見られる腎機能障害(尿量減少、クレアチニクリアランス減少)と腎血流減少を結びつけ、血管収縮に伴う腎障害の可能性を述べている。当時のstroma残存は5-10%程度と見積られている<sup>28, 29)</sup>。

1960年代、RabinerらによりSFHが確立されるが、1978年Savitskyら<sup>28)</sup>はSFHが依然としてヒトで血圧上昇と徐脈を惹起することを確認している。SFH投与により惹起される生体反応は、自覚症状として腹痛、肋骨脊椎角疼痛、生理学的反応として徐脈、血圧上昇、尿量低下、クレアチニクリアランス低下、APTT延長、Hb尿、であり<sup>28, 30)</sup>、SFHのstroma残存は0.2-1%程度と見積られる<sup>29)</sup>。Hb溶液による昇圧反応はその後も報告が続き、1986年Vogelら<sup>31)</sup>が摘出心で未修飾Hbおよび修飾Hbによる血管収縮作用が見られることを改めて示し、心血管反応は腎毒性とは独立した重要な課題であることを明示した。その後複数の研究グループ<sup>32, 33)</sup>がSFHに存在する非Hb性血管収縮因子の存在を示唆し、従ってSFHをさらに精製し高純度SFHとする研究を刺激した<sup>34-36)</sup>。1990年代に精製SFHを原料としたHb修飾体によりあらためて心血管反応の評価が行われたが、結果はHb修飾法によって異なる傾向を示し、分子内架橋型であるBaxter社DCLHbでは20-30mmHg程度を上限とする血圧上昇が確認され<sup>37-39)</sup>、一方、PEG修飾Hb<sup>40)</sup>および重合Hb<sup>41, 42)</sup>では血管収縮または血圧上昇は軽度かもしくは起こらないという報告が多い。血圧上昇の原因是血管収縮と考えられているが、血管収縮因子としては前述のごとくHb説と非Hb説が提出されており、前者はさらにEDRF不活性化説とその他の機序に整理される。

### 3. Hbによる血管収縮

#### 3.1. 血管内皮由来弛緩因子(EDRF)

血管内皮依存性の血管弛緩は内皮由来弛緩因子(EDRF)、内皮由来過分極因子(EDHF)、prostacyclin(prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>)の三者によって制御されている<sup>43)</sup>。EDHFの実体はいまだ未解明であるが<sup>44)</sup>、EDRFの本態はNOもしくはNO放出物質であることが明らかにされている<sup>7, 45)</sup>。NOはhemeと高い親和性を有し、従ってHbにより除去、不活性化され、そのためHbは内皮依存性の血管弛緩を抑制し血管収縮物質として作用しうると考えられる<sup>46)</sup>。この仮説は、Hb溶液による昇圧反応がEDRF産生阻害剤であるL-N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methylester(NAME)により再現できること<sup>47, 48)</sup>、酸素親和性を変えずNO親和性を抑制した組換えHb(rHb)は血管収縮作用が小さいこと<sup>49-51)</sup>、からも支持される。

しかしながら、Hbによる昇圧反応の特徴は極めて少量のHb投与で起きることであり、覚醒ラットでDCLHb投与量125mg/kgで最大昇圧反応が得られ、投与量をさらに増加させても血圧上昇はほとんどない<sup>38)</sup>。この時の血中セルフリーHb濃度はわずか0.16g/dL程度と算定される。一方、末梢血には赤血球Hbが15g/dL存在しており、極めて微量のセルフリーHbが血管収縮を惹起するには赤血球HbとセルフリーHbによるEDRF不活性化には大きな違いがあるものと予測される。

### 3.2. HbによるEDRF不活性化

#### オルガンバス実験

EDRF研究において、EDRF=NOであることを証拠の1つとしてオルガンバス実験で観察されるHbによる血管収縮作用がある<sup>52)</sup>。Fig. 1にオルガンバス法によるウサギ大動脈標本での内皮依存性弛緩とHbによるその逆転を示すが、Hbは濃度依存性にacetylcholine(ACh)による弛緩作用を抑制する。我々はこの血管収縮作用を種々のHb系酸素運搬体(Fig. 2)で比較した<sup>53)</sup>。

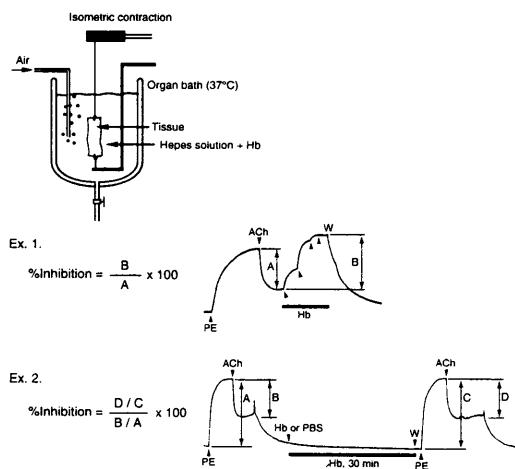


Fig. 1. Organ bath assays using rabbit aortic strips. PE, phenylephrine 1 μM; ACh, acetylcholine 1 μM; W, wash-out; PBS, phosphate-buffered saline.

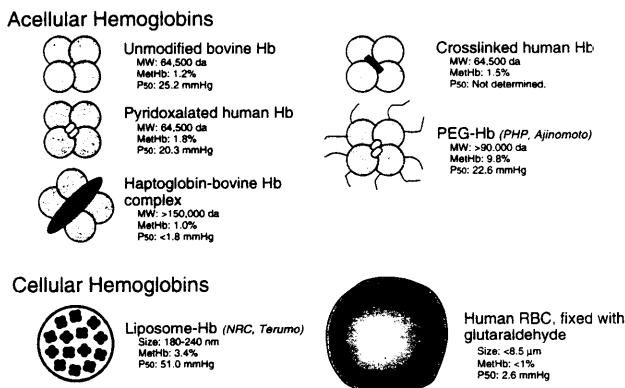


Fig. 2. Characteristics of Hb solutions used in the present study.

セルフリーHbによる血管収縮反応はその分子サイズ、酸素親和性の違いにもかかわらずほぼ同一の量-反応曲線を示す(Fig. 3)。PEG修飾Hbでは若干右に移動するが、この試料はmetHb濃度が高く、metHbとNOとの親和性が低いことに起因すると予想される。一方、リポソームおよび赤血球の量-反応曲線はそれぞれさらに右方移動し、血管収縮活性が弱いことを示した。この結果は血管内腔におけるセルフリーHbと細胞性HbとのEDRF不活性化

効率の差を示すものであるが、Hb濃度1%以上では両Hbの間に差が認められず、従ってin vivoにおけるセルフリーHbの強力な血管収縮作用を十分には説明できない。

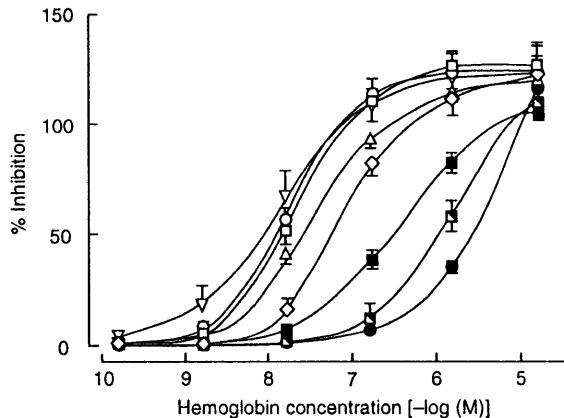


Fig. 3. Inhibition of ACh-induced relaxation in rabbit aortic strips by unmodified Hb (open circle), pyridoxalated Hb (open inverted triangles), PEG-Hb(open diamonds), Hp-Hb (open triangles), bovine Hb (open squares), metHb (checkered squares), liposome Hb (Artificial Red Cells, solid squares), or fixed human red cells (solid circles) as performed by the Ex. 1 protocol. Mean ± SE of 7-10 experiments.

このオルガンバス実験で同一血管標本を繰り返し用いた場合、未修飾Hbを添加した標本は以後のAChに対する反応性が低下するのに対し、同じセルフリーHbでもPEG-Hbでは再現良く弛緩反応が得られる現象が見られた。そこでFig. 1のEx. 2に示すプロトコールにて次の実験を行った。Fig. 4にHb濃度0.01%で得られる典型的なトレースを示す。未修飾Hbでおよそ30分暴露した標本はオルガンバス内のHbを洗浄除去後もAChによる弛緩が抑制されるが、その他のHb修飾体ではACh弛緩が維持される(Fig. 5A.)。未修飾HbによるACh反応抑制には量-反応関係が認められ、また内皮弛緩反応性は時間と共に回復することから可逆的な現象であった。同様な実験を2% BSAおよび平均分子量73,000 Daの2% dextran存在下で行った場合、両高分子はHbによる弛緩抑制を明らかに軽減した(Fig. 5B.)。以上の結果から、未修飾HbによるACh反応抑制の機構としてHbが何らかの機序で血管標本に取り込まれ、標本内部でNOを消去する可能性が示唆され、BSAおよびdextranといったマクロ分子はHb取り込みを阻害すると予想された。

#### ランゲルドルフ灌流実験

オルガンバス実験の欠点はHbが血管内皮側のみならず血管切断面および血管外側からも接することであり、そこでランゲルドルフ法によるラット心灌流実験を行った。大動脈弓より逆行性に灌流液を定速灌流しその灌流圧をモニターするとともに、bradykinin(BK)を少量単回投与し血管内皮依存性の弛緩反応を記

録した。またEDRF不活性化の関与を検証する目的で、NO合成阻害剤であるNAMEを灌流液に添加しその影響を見た。Fig. 6に示すように未修飾HbおよびPEG-Hbは濃度依存性に灌流圧を上昇させ、Hb濃度0.1%(1mg/mL)で最大値に達した。以後、灌流液Hb濃度0.1%とし詳細な検討を行った。興味あることに、Hb濃度0.1%は動物実験における最大血圧上昇が得られるHb濃度<sup>38)</sup>にほぼ等しい。

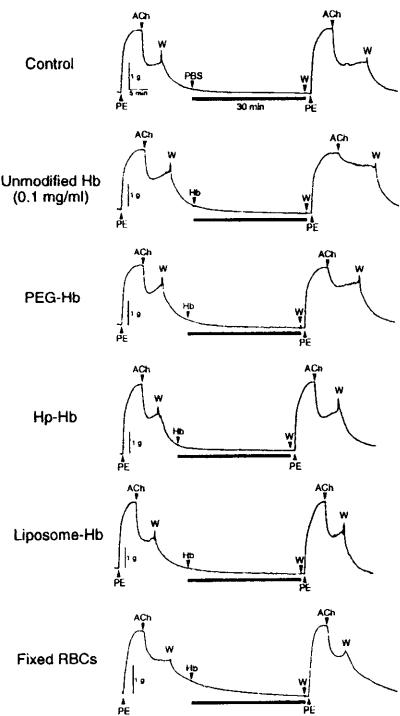


Fig. 4. Typical tracings showing inhibition of ACh-induced relaxation by several Hb preparations as performed by the Ex. 2 protocol (Hb at 0.01%).

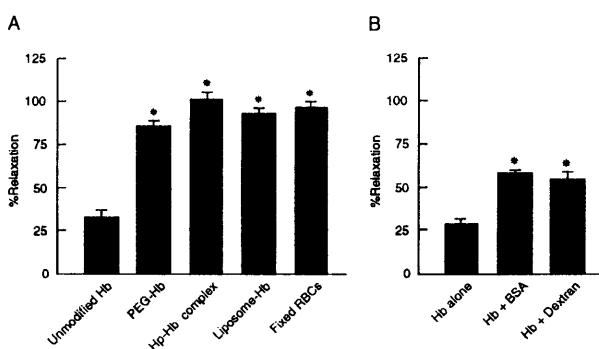


Fig. 5. Inhibition of ACh-induced relaxation by Hbs. A, Inhibitory effect of several Hb preparations (Hb at 0.01%). B, Unmodified Hb-induced inhibition in the presence of 2% BSA or 2% dextran. Means  $\pm$  SE of 5-12 experiments. \*p<0.01 as compared with unmodified Hb.

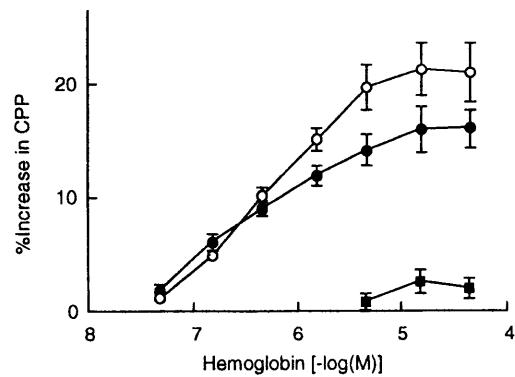


Fig. 6. Changes in coronary perfusion pressure (CPP) by unmodified bovine Hb (open circles), PEG-Hb (closed circles) or liposome Hb (Neo Red Cells, closed squares) of rat perfused hearts. Mean  $\pm$  SE of 8-10 experiments.

典型的なトレースをFig. 7に、灌流圧変化をFig. 8A.にそれぞれ示す。セルフリーHbによる灌流ではいずれも血管収縮を誘導するが、リポソームでは検討したHb濃度1%まで血管反応は観察されない。同様の結果は重合性リポソームであるARCでも観察される<sup>54)</sup>。NAME添加は灌流圧を上昇させるが、未処理群およびHb灌流群いずれの群でもNAME添加後の灌流圧はほぼ同じレベルであった。

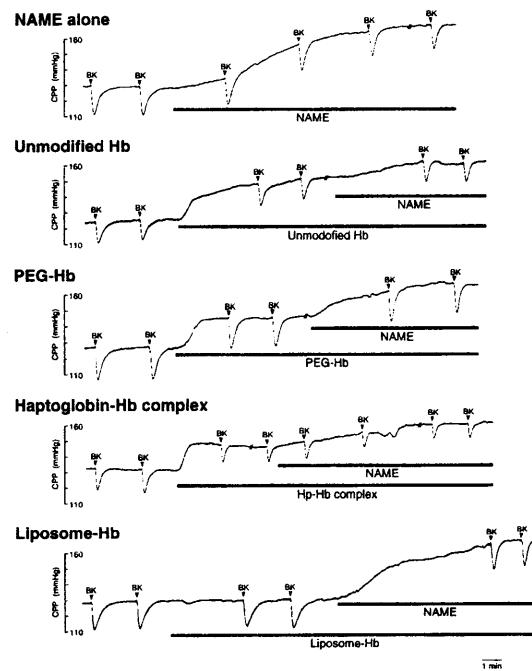


Fig. 7. Typical tracings showing Hb (0.1%)-induced vasoconstriction. BK, bradykinin 10 pmol in 4  $\mu$ L; NAME, L-N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester 100  $\mu$ M.

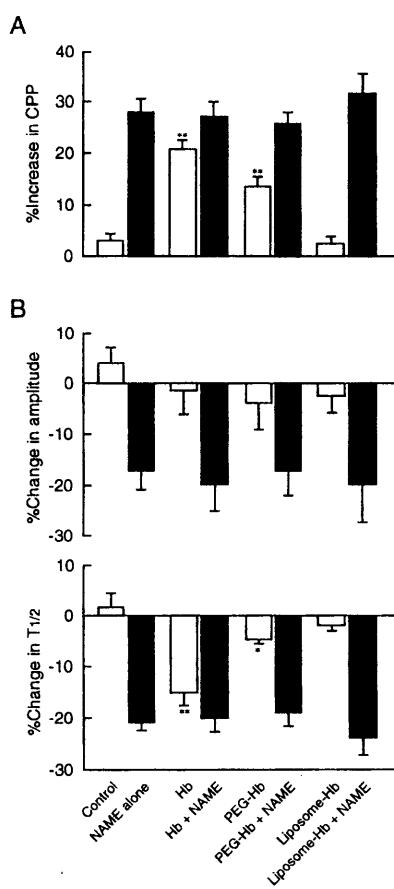


Fig. 8. Effects of Hb preparations on CPP and BK-induced relaxation. A, Changes in CPP. B, Changes in amplitude and half-life ( $T_{1/2}$ ) of the duration of BK-induced relaxation. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  as compared with control.

BK反応は灌流圧低下の大きさ(amplitude)と圧低下が半分に回復する時間( $T_{1/2}$ )に分けて解析を行った(Fig. 8B). Amplitude変化はいずれの群でもHb添加の影響は認められず、NAME添加後も条件間で差はなかった。一方、 $T_{1/2}$ は未修飾Hbで顕著に減少し、PEG-Hbも中等度減少したが、NRCでは変化は見られなかった。しかし、NAME添加後では条件間に差は認められず、 $T_{1/2}$ 変化は灌流圧変化とほぼ同様の傾向といえる。BKによる血管弛緩反応はEDHFとEDRFの合成波と考えられ、EDHFが潜時の短い弛緩を、EDRFが比較的潜時間が長い弛緩を形成する<sup>55</sup>。従って、BK反応のamplitudeは主にEDHF関連の、 $T_{1/2}$ はEDRF関連の弛緩を反映すると考えられる。本実験ではHbの影響は $T_{1/2}$ に強く表れたが、NAME添加後にHbの違いによる灌流圧変化は差がない事実と合わせ考えると、Hbの血管収縮作用はEDRF不活性化によって説明可能であり、EDHF依存性の弛緩にHbは影響しないと結論される。実際、Baxter型Hbを動物に投与した場合、持続的な全身血圧の上昇とともに、脳、心、皮膚などの一部の局所臓器の血流が増加する<sup>56,57</sup>。このような臓器の血管床はEDRFに対しEDHF優勢であると考えられ(Sakuma I. et al., 未発表データ)、HbによるEDRF不活性化の影響が相対的に小さく全身血液の再配分により血流が

逆に増加するためと推察される。なお、PGI<sub>2</sub>が優勢なヒト臍帯血管でもHbによる血管収縮はない<sup>58</sup>。

オルガンバス実験同様、本実験でも灌流液にBSAを加えその影響を観察した。Fig. 9に示す通り、最大灌流圧変化はBSAの有無にかかわらず一定であったが、BSA濃度依存性にHbによる血管収縮が遅延する傾向が見られた。高分子がHbの血管壁取り込みを拮抗的に抑制したためと解釈される。また、灌流実験で得られた最も興味ある知見はリポソームHbでは血管収縮作用が見られないという結果であり、Hbの血管壁への侵入が血管収縮と密接であるという仮説を強く支持する。

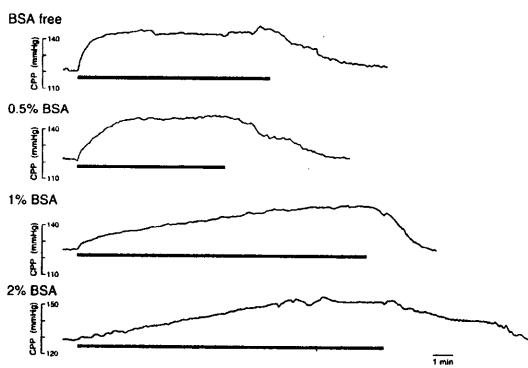


Fig. 9. Unmodified Hb-induced vasoconstriction in the presence of BSA (0 to 2%) in the perfusate. Hb at 0.1%.

#### 血管内皮透過性実験

薬理実験から血管壁へのHb取り込みが血管収縮と密接であると推測され、Hb系酸素運搬体の血管内皮透過性を直接比較することを意図しFig. 10に示すin vitro透過性実験を行った。ウシ大動脈由来血管内皮細胞をコラーゲンフィルター上に単層培養し、仮想血管内腔にHbを加え仮想基底膜側へ移動するHbを測定するものである。本実験で測定したBSAの透過速度は文献的にもよく一致し<sup>59,60</sup>、またTable 2に示す通り分子量の大きさに伴って透過性は変化した。

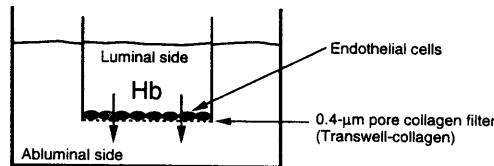


Fig. 10. Permeability measurement using cultured bovine endothelial cell monolayer.

Table 2 Endothelial permeability characteristics of proteins having different molecular weight (Mw.)

Molecule	Mw. (Da)	Permeability coefficient ( $\times 10^{-6}$ cm/sec) <sup>1</sup>	n
Cytochrome c	12,000	19.73 ± 2.09	3
Peroxidase	44,000	10.25 ± 0.65	3
Bovine serum albumin	66,000	3.82 ± 0.11	3
Bovine Hb (HbBv)	64,500	5.80 ± 0.33	7
Lactoperoxidase	84,000	2.87 ± 0.23	3
Hp-HbBv complex	>150,000	0.35 ± 0.02	6

<sup>1</sup>Mean ± SEM.

Hb分子量はBSAにはほぼ等しいが、測定された未修飾Hbの透過速度はBSAの約2倍であった(Fig. 11.). Hbへの分子内架橋により透過性は軽度ながら明らかに低下するがBSAよりも依然として高く、Hbの高透過性はdimerへの解離性によるものではなく、分子形状や荷電が大きく影響していると予想される<sup>60, 61</sup>. 一方、Hb分子量を増大させるPEG修飾もしくはhaptoglobin結合は透過性を顕著に抑えており、小さなHb修飾体ほど透過性が高く血管外漏出することを示している。なお、PEG-Hb修飾ではアミノ基修飾によるため荷電が変わると予想され、またPEG-Hbはゲルろ過HPLCでより大きな分子として挙動することがわかっており<sup>62</sup>、PEG-Hbの透過性を論ずるにはより詳細な解析が必要である。

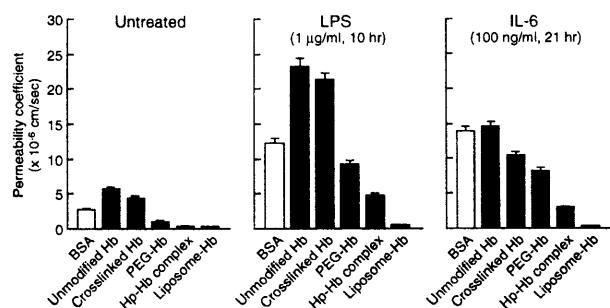


Fig. 11. Permeability characteristics of several Hb preparations in untreated, LPS (1  $\mu$ g/mL, 10 hr)-treated or IL-6 (100 ng/mL, 21 hr)-treated monolayers.

血管内皮バリアー能は種々のストレス条件で低下することが知られ<sup>63, 64</sup>、特にLPS<sup>65, 66</sup>や炎症性サイトカインであるIL-6<sup>67</sup>により血管内皮間隙が拡張し血漿成分の血管外漏出が亢進する。Hb系酸素運搬体がこのような病態生理条件下で使用されることを念頭に置き、内皮細胞をあらかじめIL-6やLPSで処理し同様な実験を行った。結果はセルフリーHbの透過性は著しく増加し、特にLPS

処理で顕著であった(Fig. 11.). 一方、リポソームはいずれの条件でも透過性は極めて限定されたものであり、細胞性であることの一つの特徴と考えられる。

以上の実験から、Hbによる血管収縮の機序として、Hb分子が血管壁になんらかの形で取り込まれることが必要であり、その取り込みは少なくとも分子サイズに依存し低分子ほど血管収縮作用も強いことが示唆された(Fig. 12.). 実際、血中投与された分子内架橋型Hbは速やかにリンパに出現し<sup>68</sup>、Hb程度の分子サイズに対して内皮バリアーは完全には機能しないことがうかがえる。また、分子内架橋型であるDCLHbと未修飾Hbはほぼ同じ血管収縮作用を示し<sup>69</sup>、DCLHbへのPEG修飾により昇圧作用は軽減する<sup>57</sup>。さらに、血漿および膜結合型carboxypeptidaseによりHbα鎖C末端の141番目Argを切り出されたdes- $\alpha$  Arg141 Hbはdimerへの解離が亢進するが、ラット摘出心灌流実験では血管収縮活性が未修飾Hbよりも高い<sup>70</sup>。このような報告は、血管収縮活性と血管内皮透過性がよく符合することを強く示唆している。

Hb分子が血管壁に侵入する経路については明確ではないが、Hbが血管内皮細胞間隙の一部に入り込むことは免疫電顕による検索で既に報告されており<sup>71, 72</sup>、内皮間隙から基底膜側に漏れる可能性が高いと考えられる。

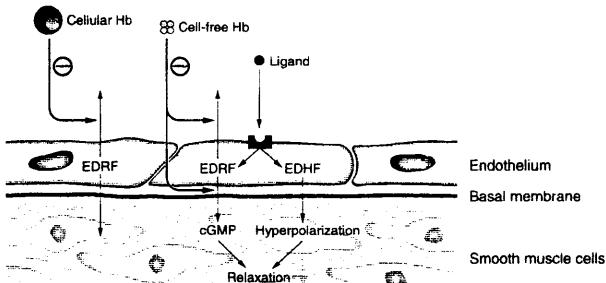


Fig. 12. Possible mechanism of acellular Hb-induced vasoconstriction as a result of abluminal EDRF scavenging.

### 3.3. Hbによる血管収縮—EDRF不活性化以外の可能性

セルフリーHbは血管床 $\alpha$ -受容体のカテコールアミン感受性を増加させ昇圧反応を惹起させる可能性があり<sup>73</sup>、西ら<sup>74</sup>もHbによるも中枢神経系および末梢神経系への作用を示唆している。その機序について詳しい報告は出されていない。

前項でHbの血管外漏出を述べたが、血管壁でHbはheme鉄を放出し、過剰hemeが一時的に活性酸素種を産生する可能性が多くの研究者により提唱されている<sup>74-76</sup>。HsiaはBaxter型Hb修飾体による血管収縮がSOD様およびcatalase様scavenger作用により消失することから、Hbが血管壁にて活性酸素種を生成し内皮傷害が誘導され、その結果として血管収縮が惹起される機構を提案している(personal communication)。ただしBaxter社は活性酸素生成そのものに懐疑的な資料をもつ<sup>57, 77</sup>。Hb系酸素運搬体投与による骨

髓での赤血球造血作用への影響はなく<sup>78</sup>、血管内皮傷害を立証する証拠もまだない。

#### 4. 非Hb性血管収縮因子の候補

Hb溶液による血管収縮が非Hb因子であるとする最大の論拠は、SFH製造法により血管収縮活性が異なるという事実に基づく。SFHをATP-agaroseアフィニティクロマトグラフィー<sup>31)</sup>もしくは陰イオン交換樹脂HPLC<sup>33)</sup>で精製すると血管収縮活性は減少する。ただし、陰イオン交換樹脂精製<sup>30,31)</sup>は効果がないとする報告もある。Gilroyら<sup>79)</sup>は2.8 Mリン酸緩衝液で結晶化するDeVenutoら<sup>80)</sup>のSFHを原料として重合Hbを作製した場合、血管収縮を抑制できることを見出している。一方、SFHの心血管反応はpyridoxalation<sup>31)</sup>、透析処理<sup>31)</sup>、亜鉛沈殿<sup>30)</sup>、クロロホルム抽出<sup>79)</sup>では変化しない。以上の共通項から、血管収縮因子として、Hbと会合し挙動を同一にする親水性小分子<sup>79)</sup>という特徴が推測される。この候補として、我々は赤血球膜由来リン脂質代謝物の一つであり、両親媒性を有するlysophosphatidylcholine(LysoPC)がSFHに存在し、SFHより抽出したLysoPCが内皮依存性弛緩反応を一過性に抑制することを示した<sup>81)</sup>。MacDonaldら<sup>33)</sup>はかつてpeptide説を提出しており、別のグループにより赤血球膜に存在するある種のhigh molecular weight aspartic endopeptidase<sup>82)</sup>が酸性条件でウシHbβ鎖の特異的部位切断を行い、冠動脈に対し血管収縮活性を有する生理活性peptideを合成することもわかっているが<sup>83)</sup>、SFHにおける検討はない。クロマトグラフィー精製効果は前述のcarboxypeptidaseを含めpeptidases除去という側面を示すものかも知れない。なお、最近のクロマトグラフィーによるHb溶液精製の応用として、例えばHemosol社では、Hb溶液を陰イオン次いで陽イオン交換樹脂カラムで処理しHbAoのみ素通りさせる方法を採用しており、SFHからのHbAo精製で純度99%以上と報告されている(Hbのうち最も高頻度に存在するHb分子種はHbAoであり、溶血液Hbに占める割合はおよそ90%)。

血管壁に取り込まれたHbが刺激となり血管内皮から強力な血管収縮物質であるendothelinが分泌されるという報告<sup>84-87)</sup>が集まっている。特にin vivoでの持続的な血圧上昇にはendothelinが重要でEDRF不活性化の関与は少ないとの報告<sup>88)</sup>が注目に価するが、endothelin関与を否定する論文<sup>89,90)</sup>も相次いでおり確定的ではない。Hb溶液による血管収縮は潜時の極めて短い現象であり、少なくともこの収縮初期でのendothelinの関与はないと思われる<sup>90)</sup>。

Hbとarachidonic acidについて、Hbはcyclooxygenase活性を有しPGE2およびPGF2αを産生する<sup>91)</sup>。また、NOはhemeと親和性がありheme蛋白酵素活性の調節に関与する(Rifkind, A.B., personal communication)。Prostaglandin H synthaseはNOにより活性化しprostacyclinおよびthromboxane(TX)合成を促進する<sup>92)</sup>。Cytochrome P-450もarachidonic acid代謝能を有し<sup>93)</sup>、細動脈血管内皮に存在するcytochrome P-450が酸素センサーとして働き局所酸素分压に応じて血管収縮性arachidonic acid代謝物20-HETEを生成し血流調節を担うとの仮説もある<sup>94)</sup>。HbによるNO除去はarachidonic acid代謝物産生の変動を介して血管緊張を左右するかもしれない。実際、ラット摘出腎ではSFHが尿中TX分泌を刺激し血管抵抗増加に寄与するとの報告がある<sup>95)</sup>。ただし、ウサギ灌流肺標本における血管収縮はcyclooxygenase阻害剤diclofenacで変

化せず、SFHによるTX産生も赤血球膜断片を含むHb溶液で顕著であるものの、高純度SFHもしくは修飾Hbでは否定されており<sup>96,97)</sup>、TX産生機構は明らかではない。従って、Hb溶液による血管収縮でのarachidonic acid代謝物の関与はまだ明確ではない。

最後に、粘性も血管収縮と密接でありIntagliettaのグループの研究が注目されている。コロイド溶液による高度交換輸血では高粘性では血管弛緩し組織灌流が改善するが、低粘性では逆に血管収縮に働く<sup>98)</sup>。粘性が高い場合shear stressにより血管内皮からの弛緩因子放出を刺激するためと推測されている。同様な作用がセルフリーHbにも期待され、組織灌流の視点から検討が行われつつあり<sup>99)</sup>、血管収縮に伴う血圧上昇の副次的な効果を含め研究の進展が期待される。

#### 5. 血管収縮を巡る課題

血管収縮に起因する血圧上昇は持続的であるものの、上昇の程度は限られている。従って、血管収縮を毒性とみるか、許容しうる生体反応と見るかは議論の余地がある<sup>100)</sup>。Baxter型Hb修飾体であるDCLHbは血管収縮が顕著であるが、出血性ショックにおける血圧回復に対しては逆に有用と考えられている<sup>101-103)</sup>。Sepsisでは誘導型NO合成酵素により産生される過剰NOにより低血圧となるが、DCLHb<sup>99)</sup>およびPEG-Hb<sup>104)</sup>はEDRF消去作用により循環動態の回復に効果が認められる。さらに、脳循環では重合Hb<sup>105)</sup>およびDCLHb<sup>106)</sup>投与による血管収縮は認められず、脳循環血流量は変化なしもしくは逆に増加するという。理由はEDHF支配と血液-脳関門の存在と考えられるが、虚血性脳障害軽減を意図したHb修飾体応用が模索されている所以である<sup>107)</sup>。一方、血圧上昇は細動脈の血管収縮に起因するため、本来酸素を解離すべき毛細血管への血流が減少し酸素運搬に対立する可能性も指摘されている<sup>2)</sup>。血管収縮は血管内皮バリアーが解剖学的に低くEDRF優勢の血管床で顕著であるとすれば、全身血液の再配分の結果を慎重に考慮する必要がある<sup>108)</sup>。さらに、酸素運搬体を使用する病態生理条件下では血管内皮バリアーが低下しているが、脳循環においても虚血に引き続いて血液-脳関門の低下を伴い浮腫となる<sup>109)</sup>。セルフリーHbによる血管収縮作用を利点として応用する視点は大変興味が持たれるものの、血管収縮機構の解明と血管収縮がもたらす結果について詳細な研究が望まれる。

Hb溶液の古典的な標的臓器は腎臓であり<sup>18)</sup>、腎毒性回避がHb修飾体開発の最大の視点であった<sup>19)</sup>。現在、Hb修飾体による明らかな腎毒性は認められないものの<sup>100)</sup>、尿量および電解質代謝に影響を及ぼすことが知られ<sup>110,111)</sup>、腎機能への影響が完全に解決された訳ではない<sup>5)</sup>。最近、NOと腎機能との関連性が注目され、糸球体内皮細胞<sup>112)</sup>およびメサンギウム細胞<sup>113)</sup>がNO産生能を有し、腎皮質血管床弛緩に強く関与することが示され<sup>114,115)</sup>、NOが糸球体透過性、血流、ろ過速度に影響すると考えられている<sup>113)</sup>。未だ確証はないが、Hbによる軽度の腎機能障害とNO除去には何らかの関連性があるかもしれない。腎に次いで血管内皮細胞が特異なfenestration構造を持つ肝臓もHbの標的臓器の一つであるが、肝循環における弛緩因子はcarbon monoxide(CO)とされ<sup>116)</sup>、COはNOと同様にHbと親和性がありHbによる血管収縮が起こると報告されている。

ヒトでの臨床試験により、Hb修飾体による腹痛が注目されて

いる。多くは分子内架橋型Hbによる臨床試験で観察され<sup>20)</sup>、機能的にはrHb1.1は食道括約筋弛緩の抑制<sup>117)</sup>、食道蠕動性収縮の亢進<sup>117)</sup>、胆管収縮<sup>118)</sup>を引き起こす。重合HbであるHemolink<sup>TM</sup>も腸管収縮と基底圧亢進を惹起し、L-arginineは無効であるがnitroglycerinで拮抗的に作用する<sup>119)</sup>。NOは非アドレナリン作動性非コリン作動性神経性弛緩作用における伝達物質と考えられており<sup>120)</sup>、腹痛を含む消化器症状はHbによるNO不活性化が原因と想定されている<sup>117)</sup>。ただしPEG修飾ウシHbでは消化器系の血流及び運動への影響はない<sup>40)</sup>。

最後に、Hbによる血管収縮はEDRF不活性化説、endothelin説、活性酸素説、いずれにしてもHbの血管壁漏出が背景にあるものと推察され、血液が常に接する血管内皮をHbの最大の標的臓器としてと認識することが重要と思われる<sup>46)</sup>。Hb修飾体分子量の基準は、Bunnら<sup>19)</sup>の分子内架橋型Hbによる腎ろ過回避実験によるところが大きいが、内皮バリアーを考慮したHb修飾体の分子設計を考えた場合、より大きな高分子量体が求められる。宮尾<sup>61)</sup>は全身の様々な血管床を考慮して下限分子量30万Da、サイズ30 nmを提唱している。最近になって、Baxter社およびSomatogen社は分子内架橋型Hbの高分子化を模索し、それぞれPEG鎖を応用した分子量30万程度の重合型Hb<sup>111)</sup>、tetramer外表面に単一SH基を導入したrHbを利用する重合PentaHb(実際は3から9個のHbからなる)<sup>121)</sup>を作製しており、ともに血管収縮作用の軽減が確認されている。その他の重合Hbでは一般的に血管収縮は見られないが、その分子量分布は単量体を少量含み上限40万から60万である。Biopure社は重合Hbによるヒト臨床試験に際し低分子Hb画分の排除をより厳密に行っている(ヒト用重合Hb HBOC-201は獣医臨床試験で用いられている HBOC-301より低分子画分が少なく平均分子量がその分大きい)。セルフリーHb修飾体の最適分子量はまだ未解決の課題と考えるべきである。

## まとめ

Hb系酸素運搬体の研究は赤血球輸血代替を意図して開始され、DCLHbは具体的に心臓手術時の対外循環を適応に同種血輸血回避をendpointとして欧州で医薬品申請する段階まで到達した。血管収縮など副作用を理由に商品化に悲観的な考え方<sup>122)</sup>がある一方、血管収縮を逆に利用する戦略も有効であり、Winslow<sup>100)</sup>は開発研究者の多くが楽観的な見解であると反論している。研究進展のためには企業主導による臨床研究と並行して、血管収縮などHb修飾体の副作用の機序を明らかにする基礎研究が急がれると思われる。また、1997年の米国での臨床成績に関わるmeeting (IBC's 5th Annual Conference)では、今後の研究展開に基礎と臨床研究との情報交換が必須と強調されていた。一つの例として最近、AZTによるHIV治療の貧血時にrHb投与が有効との報告がある<sup>123)</sup>。AZTによる貧血はheme合成阻害に起因しheme投与が著効する。rHbは血中半減期が短く慢性貧血には適応がないものの、rHbをheme供給源とみるならば新しい臨床応用が可能と期待される。我が国でも血液代替物研究は厚生科学研究による事業として位置づけられており<sup>124)</sup>、Hb系酸素運搬体研究の今後の発展が期待されるが、基礎と臨床分野との共同研究が強く求められているかもしれない。

## 謝辞

本稿の実験を遂行するにあたりご指導賜わった関口定美先生(北海道赤十字血液センター)、高橋恒夫先生(東京大学)、中里幸和先生(北海道大学)、および投稿の機会を与えていただいた土田英俊先生(早稲田大学)に深謝申し上げます。

## 参考文献

1. Hess JR. Review of modified hemoglobin research at Letterman: Attempts to delineate the toxicity of cell-free tetrameric hemoglobin. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1995;23:277-89.
2. Winslow RM. Blood substitutes-a moving target. *Nat Med* 1995; 1:1212-5.
3. 関口定美. 人工酸素運搬体としての人工血液の開発と臨床応用. *日本臨床* 1997;55:2439-46.
4. 岩下雄二. 酸素運搬体臨床研究の現況. *人工臓器* 1997;26:920-6.
5. Loscalzo J. Nitric oxide binding, the adverse effects of cell-free hemoglobins: What makes us different from earthworms. *J Lab Clin Med* 1997;129:580-3.
6. 土田英俊、武岡真司. 血液代替物：最近の進歩. *人工血液* 1993;1:5-10.
7. 西勝英、木田吉俊. ヘモグロビン系人工酸素運搬体の循環器系に対する作用. *人工血液* 1994;2:82-93.
8. Tsuchida E. Introduction: Overview and Prospectives. In: Tsuchida E, ed. *Artificial Red Cells. Materials, Performances and Clinical Study as Blood Substitutes*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1995;1-20.
9. Naunyn B. Beitrage zur Lehre vom Icterus. *Archiv Anat Physiol Wiss Med* 1868;401-41.
10. Odling-Smee GW, Wilson BG. Haemoglobin as a blood substitute. In: Lowe KC, ed. *Blood Substitutes. Preparation, Physiology and Medical Applications*. Chichester: Ellis Horwood Ltd., 1988;71-86.
11. Von Stark G. Die Resorborbarkeit des Haimatins und die Bedeutung der Haemoglobin-praparate. *Deutsche Med Wochenschr* 1898;24:805-8.
12. Sellards AN, Minot GR. Injection of hemoglobin in man and its relation to blood destruction with especial reference to the anemias. *J Med Res* 1916;34:469-94.
13. Amberson WR, Flexner J, Steggerda FC, Mulder AG, Tendler MJ, Pankratz DS, Lang EP. On the use of Ringer-Locke solutions containing haemoglobin as a substitute for normal blood in mammals. *J Cell Comp Pathol* 1934;5:359-82.
14. Fronticelli C, Bucci E, Orth C. Solvent regulation of oxygen affinity in hemoglobin. *J Biol Chem* 1984;259:10841-4.
15. Perutz MF, Imai K. Regulation of oxygen affinity of mammalian haemoglobins. *J Mol Biol* 1980;136:183-91.
16. Benesch RE, Benesch R, Renthal RD, Maeda N. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin. *Biochemistry* 1972;11:3576-82.

17. Sheffield CL, DeLoach JR. Nonencapsulated hemoglobin-based red blood cell substitutes: An updated view. *Biotechnol Appl Biochem* 1991;14:249-55.
18. Rabiner SF, Helbert JR, Lopas H, Friedman LH. Evaluation of a stroma-free hemoglobin solution for use as a plasma expander. *J Exp Med* 1967;126:1127-42.
19. Bunn F, Esham W, Bull R. The renal handling of hemoglobin. *J Exp Med* 1969;129:909-24.
20. Viele MK, Weiskopf RB, Fisher D. Recombinant human hemoglobin does not affect renal function in humans: analysis of safety and pharmacokinetics. *Anesthesiology* 1997;84:848-58.
21. Fratantoni JC. Points to consider in the safety evaluation of hemoglobin-based oxygen carriers. *Transfusion* 1991;31:369-71.
22. Hardison RC. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5675-9.
23. Barcroft J. The raison d'être of the red corpuscle. *The Harvey Lectures*, Philadelphia and London. 1922.
24. Bayliss WM. Is haemolysed blood toxic? *Br J Exp Pathol* 1920;1: 1-9.
25. Pheister DB, Handy J. Vascular properties of traumatised and laked bloods. *J Physiol* 1927;64:155-73.
26. Amberson WR, Jennings JJ, Rhode CM. Clinical experience with haemoglobin-saline solutions. *J Appl Physiol* 1949;1:469-89.
27. Miller JH, McDonald RK. The effect of haemoglobin on renal function in the human. *J Clin Invest* 1951;30:1033-40.
28. Savitsky JP, Doczi J, Black J, Arnold JD. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther* 1978;23:73-80.
29. Nakai K, Sekiguchi S. Quality control of stroma-free hemoglobin. In: Tsuchida E, ed. *Artificial Red Cells*. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1995;131-49.
30. White CT, Murray AJ, Greene JR, Smith DJ, Medina F, Makovec GT, Martin EJ, Bolin RB. Toxicity of human hemoglobin solution infused into rabbits. *J Lab Clin Med* 1986;108:121-31.
31. Vogel WM, Dennis RC, Cassidy G, Apstein CS, Valeri CR. Coronary constrictor effect of stroma-free hemoglobin solutions. *Am J Physiol* 1986;251:H413-20.
32. Lieberthal W, Wolf EF, Merrill EW, Levinsky NG, Valeri CR. Hemodynamic effects of different preparations of stroma free hemolysates in the isolated perfused rat kidney. *Life Sci* 1987;41: 2525-33.
33. MacDonald VW, Winslow RM, Marini MA, Klinker MT. Coronary vasoconstrictor activity of purified and modified human hemoglobin. *Biomat Art Cells Art Org* 1990;18:263-82.
34. Nakai K, Matsuda N, Abe H, Kobayashi M, Ikeda H, Morizawa K, Nakachi O, Ishikawa G, Sekiguchi S. Usefulness of a virus removal filter BMM to remove stroma from hemoglobin solutions. *Jpn J Artif Organs* 1992;21:318-22.
35. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. *Protein Expr Purif* 1993;4:563-9.
36. Winslow RM, Chapman KW. Pilot-scale preparation of hemoglobin solutions. *Methods Enzymol* 1994;231:3-16.
37. Keipert PE, Gonzales A, Gomez CL, MacDonald VW, Hess JR, Winslow RM. Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspirin-crosslinked hemoglobin solution. *Transfusion* 1993;33:701-8.
38. Malcolm DS, Hamilton IN, Schultz SC, Cole F, Burhop KE. Characterization of the hemodynamic response to intravenous diaspirin crosslinked hemoglobin solution in rats. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1994;22:91-107.
39. Gulati A, Sharma AC, Burhop KE. Effect of stroma-free hemoglobin and diaspirin cross-linked hemoglobin on the regional circulation and systemic hemodynamics. *Life Sci* 1994; 55:827-37.
40. Conover CD, Lejeune L, Shum K, Shorr RGL. The influence of polyethylene glycol conjugation on bovine hemoglobin's intrinsic effect on the gastrointestinal system of the rat. *Life Sci* 1996;59: 1861-9.
41. Gould SA, Sehgal LR, Sehgal HL, Moss GS. The development of hemoglobin solutions as red cell substitutes: hemoglobin solutions. *Transfusion Sci* 1995;16:5-17.
42. Gonzalez P, Hackney AC, Jones S, Strayhorn D, Hoffman EB, Hughes G, Jacobs EE, Orringer EP. A phase I/II study of polymerized bovine hemoglobin in adult patients with sickle cell disease not in crisis at the time of study. *J Invest Med* 1997;45: 258-64.
43. 佐久間一郎, 深尾充宏, 北畠顯. EDHFと循環調節. 呼吸と循環 1996;44:605-13.
44. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Evidence against a role of cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolites in endothelium-dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1997;120:439-46.
45. 佐久間一郎. 血管弛緩因子としてのNO. 実験医学 1991;9: 1347-51.
46. Motterlini R, Vandegriff KD, Winslow RM. Hemoglobin-nitric oxide interaction and its implications. *Transfuion Med Rev* 1996; 10:77-84.
47. Ulatowski J, Koehler R, Nishikawa T, Traystman R, Razynska A, Kwansa H, Urbaitis B, Bucci, E. Role of nitric oxide scavenging in peripheral vasoconstrictor response to beta beta cross-linked hemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immobil* 1995;23:263-9.
48. Ulatowski JA, Nishikawa T, Matheson UB, Bucci E, Traystman RJ, Koehler RC. Regional blood flow alterations after bovine fumaryl beta beta-crosslinked hemoglobin transfusion and nitric oxide synthase inhibition. *Crit Care Med* 1996;24:558-65.
49. Eich RF, Li T, Lemon DD, Doherty DH, Curry SR, Aitken JF, Mathews AJ, Johnson KA, Smith RD, Phillips GNJ, Olson JS. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry* 1996;35:6976-83.
50. Olson JS, Eich RF, Smith LP, Warren JJ, Knowles BC. Protein

- engineering strategies for designing more stable hemoglobin-based blood substitutes. *Artif Cells Blood Substitute Immobilization Biotechnol* 1997;25:227-41.
51. Doherty DH, Curry SR, Davidson JS, Pagratis M, Blackmore RS, Doyle MP, Vincellette JE, Cassens M, Fattor TJ, Vali RJ, Olson JS, Lemon DD. Recombinant hemoglobins for oxygen-carrying therapeutics: Control of NO scavenging and O<sub>2</sub> binding. Abstracts, VII International Symposium on Blood Substitutes (7-ISBS) 1997;73.
  52. Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchtgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;232:708-16.
  53. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, Sekiguchi S. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: Comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:115-23.
  54. Nakai K, Usuba A, Ohta T, Kuwabara M, Nakazato Y, Motoki R, Takahashi TA. Coronary vascular bed perfusion with a polyethylene glycol-modified hemoglobin-encapsulated liposome, Neo Red Cell, in rats. *Artif Organs* 1998;22:320-5.
  55. Sakuma I, Asajima H, Fukao M, Tohse N, Tamura M, Kitabatake A. Possible contribution of potassium channels to the endothelin-induced dilation of rat coronary vascular beds. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(Suppl. 8):S232-4.
  56. Lieberthal W, Vogel WM, Apstein CS, Valeri CR. Studies of the mechanism of the vasoconstrictor activity of stroma-free hemoglobin in the isolated perfused rat kidney and rabbit heart. In: *The Red Cell: Seventh Ann Arbor Conference*. A.R. Liss, 1989;407-22.
  57. Nolte D, Botzlar A, Pickelmann S, Bouskela E, Messmer K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: A study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med* 1997;130:314-27.
  58. Jing M, Panico FG, Panico JL, Ledvina MA, Bina S, Muldoon SM. Diaspirin cross-linked hemoglobin does not alter isolated human umbilical artery or vein tone. *Artif Cells Blood Substit Immobilization Biotechnol* 1996;24:621-8.
  59. Casnocha SA, Eskin SG, Hall ER, McIntire LV. Permeability of human endothelial monolayers: effect of vasoactive agonists and cAMP. *J Appl Physiol* 1989;67:1997-2005.
  60. Malik AB, Lynch JJ, Cooper JA. Endothelial barrier function. *J Invest Dermatol* 1989;93:62S-7S.
  61. 宮尾秀樹. 血管透過性と修飾ヘモグロビンの下限分子量. *人工血液* 1996;4:45-50.
  62. Iwashita Y. Pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP) as an oxygen carrier. *Artif Organs Today* 1991; 1:89-114.
  63. Barrios R, Inoue S, Hogg JC. Intercellular junctions in "shock lung". *Lab Invest* 1977;36:628-35.
  64. Todd TRJ, Baile E, Hogg JC. Pulmonary capillary permeability during hemorrhagic shock. *J Appl Physiol* 1978;45:298-306.
  65. Goldblum S, Brann T, Ding X, Pugin J, Tobias P. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein and soluble CD14 function as accessory molecules for LPS-induced changes in endothelial barrier function, *in vitro*. *J Clin Invest* 1994;93:692-702.
  66. Ishii Y, Shuiyi W, Kitamura S. Soluble CD14 in serum mediates LPS-induced increase in permeability of bovine pulmonary arterial endothelial cell monolayers *in vitro*. *Life Sci* 1995;56: 2263-72.
  67. Maruo N, Morita I, Shirao M, Murota S. IL-6 increases endothelial permeability *in vitro*. *Endocrinology* 1992;131:710-4.
  68. Bleeker WK, Van Der Plas J, Feitsma RIJ, Agterberg J, Rigter G, De Vries-Van Rossen A, Pauwels EKJ, Bakker JC. In vivo distribution and elimination of hemoglobin modified by intramolecular cross-linking with 2-nor-2-formylpyridoxal 5'-phosphate. *J Lab Clin Med* 1989;113:151-61.
  69. Ledvina MA, Hart JL, MacDonald VW, Muldoon SM. Comparison of the vascular effects of hemoglobin Ao (HbAo) and diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHbx). *FASEB J* 1995;10:A603.
  70. Michel B, Igic R, Leray V, Deddish PA, Erdös EG. Removal of Arg141 from the  $\alpha$  chain of human hemoglobin by carboxypeptidases N and M. *Circ Res* 1996;78:635-42.
  71. Pietra G, Szidon J, Leventhal M, Fishman A. Hemoglobin as a tracer in hemodynamic pulmonary edema. *Science* 1969;166: 1643-6.
  72. Milici AJ, Bankston PW. Fetal and neonatal rat intestinal capillaries: permeability to carbon, ferritin, hemoglobin, and myoglobin. *Am J Anat* 1982;165:165-86.
  73. Gulati A, Rebello S. Role of adrenergic mechanisms in the pressor effect of diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1994;124:125-33.
  74. Paller MS. Hemoglobin- and myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. *Am J Physiol* 1988; 255:F539-44.
  75. Motterlini R, Foresti R, Vandegriff K, Intaglietta M, Winslow R. Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am J Physiol* 1995;269:H648-55.
  76. Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radical Biol Med* 1997;22:1075-99.
  77. Pincemail J, Detry O, Philipart C. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb): absence of increased free radical generation following administration in a rabbit model of renal ischemia and reperfusion. *Free Radical Biol Med* 1995;19:1-9.
  78. Rollwagen FM, Gafney WCM, Pacheco ND, Davis TA, Hickey TM, Nielsen TB, Rudolph AS. Multiple responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin (LEH): Effects on hematopoiesis and serum IL-6 levels. *Exp Hematol*

- 1996;24:429-36.
79. Gilroy D, Shaw C, Parry E and Odling-Smee W. Detection of a vasoconstrictor factor in stroma-free haemoglobin solutions. *J Trauma* 1988;28:1312-6.
  80. DeVenuto F, Zuck TF, Zegna AI, Moores WY. Characteristics of stroma-free hemoglobin prepared by crystallization. *J Lab Clin Med* 1977;89:509-16.
  81. Nakai K, Matsuda N, Ohta T, Amano M, Takahashi TA, Sakuma I, Kitabatake A, Ito S, Nakazato Y, Sekiguchi S. Lysophosphatidylcholine, a component of stromal phospholipids, as a candidate vasoconstrictive factor present in stroma-free hemoglobin. *Artif Organs* 1994;18:198-205.
  82. Takeda M, Ueno E, Kato Y, Yamamoto K. Isolation, and catalytic and immunochemical properties of cathepsin D-like acid proteinase from rat erythrocytes. *J Biochem* 1986;100:1269-77.
  83. Barkhudaryan N, Kellermann J, Galoyan A, Lottspeich F. High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronary-constrictory peptide from the  $\beta$ -chain of hemoglobin. *FEBS Lett* 1993;329:215-8.
  84. Cocks TM, Malta E, King SJ, Woods RL, Angus JA. Oxyhaemoglobin increases the production of endothelin-1 by endothelial cells in culture. *Eur J Pharmacol* 1991;196:177-82.
  85. Schultz SC, Grady B, Cole F, Hamilton I, Malcolm D. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin crosslinked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1993;122:301-8.
  86. Fuwa I, Mayberg M, Gadjusek C, Harada T, Luo Z. Enhanced secretion of endothelin by endothelial cells in response to hemoglobin. *Neurol Med Chir Tokyo* 1993;33:739-43.
  87. Gulati A, Singh G, Rebello S, Sharma AC. Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci* 1995;56:1433-42.
  88. Gulati A, Sen AP, Sharma AC, Singh G. Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. *Am J Physiol* 1997;273:H827-36.
  89. Simoni J, Simoni G, Lox CD, Prien SD, Shires GT. Evidence for the direct inhibition of endothelin-1 secretion by hemoglobin in human endothelial cells. *ASAIO J* 1995;41:M641-51.
  90. Tai J, Kim HW, Greenburg AG. Endothelin-1 is not involved in hemoglobin associated vasoactivities. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1997;25:135-40.
  91. Zilletti L, Ciuffi M, Franchi-Micheli S, Fusi F, Gentilini G, Moneti G, Valoti M, Sgaragli GP. Cyclooxygenase activity of hemoglobin. *Methods Enzymol* 1994;231:562-73.
  92. Davidge ST, Baker PN, Laughlin MK, Roberts JM. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H. *Circ Res* 1995;77:247-83.
  93. Nakai K, Ward AM, Gannon M, Rifkind AB.  $\beta$ -Naphthoflavone induction of a cytochrome P-450 arachidonic acid epoxidase in chick embryo liver distinct from the aryl hydrocarbon hydroxylase and from phenobarbital-induced arachidonate epoxidase. *J Biol Chem* 1992;267:19503-12.
  94. Harder DR, Narayanan J, Birks EK, Liard JF, Imig JD, Lombard JH, Lange AR, Roman RJ. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res* 1996;79:54-61.
  95. Lieberthal W, LaRaia J, Valeri CR. Role of thromboxane in mediating the intrarenal vasoconstriction induced by unmodified stroma free hemoglobin in the isolated perfused rat kidney. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1992;20:663-7.
  96. Simoni J, Feola M, Tran R, Buckner M, Canizaro PC. Biocompatibility of hemoglobin solutions. II The inflammatory reaction of human monocytes and mouse peritoneal macrophages. *Artif Organs* 1990;14:98-109.
  97. Burhop KE, Farrell L, Nigro C, Tan D, Estep T. Effects of intravenous infusions of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) on sheep. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1992;20:581-5.
  98. Tsai AG, Friesenecker B, Sakai H, McCarthy MR, Intaglietta M. Increased blood viscosity during extreme hemodilution improves microvascular tissue perfusion. *Abstract, VII International Symposium on Blood Substitutes (7-ISBS)* 1997;121.
  99. Burhop KE, Ince C, Nolte D, Gulati A, Sibbald W, Malcolm D. Overview of the effects of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) on oxygenation and perfusion of the microcirculation. *Abstract, VII International Symposium on Blood Substitutes (7-ISBS)* 1997;43.
  100. Winslow RM. Progress on blood substitutes. *Nat Med* 1997;3:474.
  101. Dunlap E, Farrel L, Nigro C, Estep T, Marchand G, Burhop KE. Resuscitation with diaspirin crosslinked hemoglobin in a pig model of hemorrhagic shock. *Artif Cells Blood Subst Immobil Biotechnol* 1995;23:39-61.
  102. Przybelski R, Nanavaty B, Goldberg C, Estep T, Schmitz T. Clinical studies with diaspirin cross-linked hemoglobin solution (DCLHb<sup>TM</sup>): a review and update. *Artif Cells Blood Subst Immobil Biotechnol* 1996;24:407.
  103. DeAngeles DA, Scott AM, McGrath AM, Korent VA, Rodenkirch LA, Conhaim RL, Harms BA. Resuscitation from hemorrhagic shock with diaspirin crosslinked hemoglobin, blood, or hetastarch. *J Trauma* 1997;42:406-14.
  104. Bone HG, Nishida K, Booke M, McGuire R, Trader L, Trader D. Effects of pyridoxalated hemoglobin-polyethylene conjugate (PHP) as an oxygen carrier. *Shock* 1995;(Supple)4:35.
  105. Waschke K, Schlock H, Albert DM, Van-Ackern K, Kuschinsky W. Local cerebral blood flow and glucose utilization after blood exchange with a hemoglobin-based O<sub>2</sub> carrier in conscious rats. *Am J Physiol* 1993;265:H1243-8.
  106. Ulatowski JA, Asano Y, Koehler RC, Traystman RJ, Bucci E. Sustained endothelial dependent dilation in pial arterioles after crosslinked hemoglobin transfusion. *Artif Cells Blood Subst Immobil Biotechnol* 1997;25:115-20.
  107. Cole DJ, Nary JC, Drummond JC, Patel PM, Jacobson WK.  $\alpha$ - $\alpha$

- diaspirin crosslinked hemoglobin, nitric oxide, and cerebral ischemic injury in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1997;25:141-52.
108. Dietz NM, Martin CM, Beltran-del-Rio AG, Joyner MJ. The effects of cross-linked hemoglobin on regional vascular conductance in dogs. *Anesth Analgesia* 1997;85:265-73.
109. Klatzo I. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol* 1987;72:236-9.
110. Matheson-Urbaitis B, San Lu Y, Fronticelli C, Bucci E. Renal and systemic-hemodynamic response to isovolemic exchange transfusion with hemoglobin cross-linked with bis(3,5-dibromosalicyl) fumarate or albumin. *J Lab Clin Med* 1995;126:250-60.
111. Abassi Z, Kotob S, Pieruzzi F, Abouassali M, Keiser HR, Fratantoni JC, Alayash AI. Effects of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. *J Lab Clin Med* 1997;129:603-10.
112. Marsden PA, Brock TA, Ballermann BJ. Glomerular endothelial cells respond to calcium-mobilizing agonists with release of EDRF. *Am J Physiol* 1990;258:F1295-303.
113. Baud L, Fouqueray B, Philippe C, Ardaillou R. Reactive oxygen species as glomerular autacoids. *J Am Soc Nephrol* 1992;2:S132-8.
114. Walder CE, Thiemermann C, Vane JR. The involvement of endothelium-derived relaxing factor in the regulation of renal cortical blood flow in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1991;102:967-73.
115. Raij L, Baylis C. Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int* 1995;48:20-32.
116. Suematsu M, Wakabayashi Y, Ishimura Y. Gaseous carbon monooxides: a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc Res* 1996;32:679-86.
117. Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor functions in humans. *Gastroenterology* 1995;109:1241-8.
118. Cullen JJ, Conklin JL, Murray J, Ledlow A, Rosenthal G. Effects of recombinant human hemoglobin on opossum sphincter of Oddi motor function in vivo and in vitro. *Digest Dis Sci* 1996;41:289-94.
119. Wong LT, Er SS, Ning J, Christoff B, Carmichael FJL. Hemolink™ induced effects on the intestinal motor function and possible treatments. Abstract, VII International Symposium on Blood Substitutes (7-ISBS) 1997;116.
120. Rattan S, Rosenthal GJ, Chakder S. Human recombinant hemoglobin (rHb1.1) inhibits nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve-mediated relaxation of internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:1211-6.
121. Trimble SP, Doyle MP, Fattor TJ, Murray JA, Vali RJ, Vinclette JE, Mathews AJ. Synthesis and properties of an oligomeric recombinant hemoglobin produced using heterobifunctional chemical crosslinking. Abstracts, VII International Symposium on Blood Substitutes (7-ISBS) 1997;112.
122. Wong J. Blood substitutes are gasping for air. *Nat Med* 1997;3:10.
123. Moqattash S, Lutton JD, Rosenthal G, Abu-Hijleh MF, Abraham NG. Effect of blood substitute, recombinant hemoglobin, on in vivo hematopoietic recovery from AZT toxicity. *Acta Haematol* 1997;98:76-82.
124. 関口定美. 厚生科学研究事業における血液代替物研究. *人工血液* 1996;4:85-9.

# Blood Program and the Possibility of Applying Red Cell Substitutes in Indonesia

*Melani Wikanta*

## Introduction

Indonesia consists of 13,667 islands with 5 big islands namely Java, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi and Irian Jaya, which are separated and surrounded by the Indian and North Pacific Ocean. It is divided into 27 provinces, 306 districts/municipalities and more than 60,000 villages.

Total population is 200 millions. Around 60% of them live in Java island, while others are scattered within the other islands.

It is no doubt and proved by the statistical data that tremendous improvements including those in health sector have been reached, along with the economical development.

## History of blood program

Blood services are derived from Bloedtransfoesi Dienst of NERKAI (Netherland Rode Kruis afdeling Indie), because Indonesia was under Dutch until 1945. In 1969, Indonesian Red Cross established Central Blood Transfusion Services to coordinate the blood program within the country, by improving the system. In 1969, 28,265 donations were found, 75% of which came from paid donors and 25% from replacements. The total number of donation was equivalent to around 0.028% of total population. The policy had been set up to increase the donation rate and encourage voluntary non-remunerated blood donation. Detailed information on improvement in health care is listed in Table 1.

Table 1 Improvement in health care

1965-1970	1990-1995
Around 100 million population	Almost 200 million population
60% of people were living below the poverty line	13.7% of people(1993) were living below the poverty line
Infant Mortality Rate 145/1,000 live births	Infant Mortality Rate 58/1,000 live births
Life expectancy 45.7 years	Life expectancy 61.5 years
Health Centers were 1,227, no sub Health Centers	Health Centers were 6,277(1992), 18,946 sub-Health Center, Integrated Health Services in villages
Around 100 hospitals	1,011 hospitals : 337 public hospitals divided into 4 type A, 37 type B, 167 type C and 129 type D
10 Blood Transfusion Services, no Central BTS until 1969	1 Central BTS, 2 Provincial BTS, 152 District BTS
No statistical data of Maternal Mortality Rate	Maternal Mortality Rate 450/100,000 in 1986, decreased to 420/100,000 in 1994
Traffic accident: demand of blood	Traffic accident >> due to the increasing number of population, fast growing income → increasing amount of vehicles are not followed by adequate road facility → demand of blood >>

It was a difficult effort to combat the blood commercialization, however, this effort had been backed up by the government. A National Blood Policy namely Government Regulation No. 18 had been decreed in 1980. The important points of Government Regulation No. 18, 1980 are as follows:

1. Indonesian Red Cross was assigned to run Blood Transfusion Services as a single executioner.

2. Blood procurement shall be done voluntarily without any compensation in any form whatsoever.
3. Prohibition of blood trading, except for scientific research purposes and/or in the framework of cooperation between Indonesian Red Cross Society and the other Red Cross or other agencies which are not commercial in nature subject to prior approval of the minister, and other purposes at the discretion of the minister.
4. Blood Transfusion Service must be performed in conformity with

Director of Indonesian Red Cross Central Blood Transfusion Services, Jakarta, 7, Jalan Joe Lenteng Agung, 12610, Indonesia.

the need in supporting health service.

5. A service charge could be drawn to cover the processing expenses.
6. The government may grant subsidy, regulated by the minister.
7. The Indonesian Red Cross may issue certificate of award to blood donors.

This regulation followed with Minister of Health's Decree and Guidelines from Directorate General of Medical Care.

#### Organization Structure

The organizational structure showing the coordination between Department of Health and Indonesian Red Cross Society, as well the organizational chart of Indonesian Red Cross Blood Transfusion Services are shown in Fig. 1 and Fig. 2.

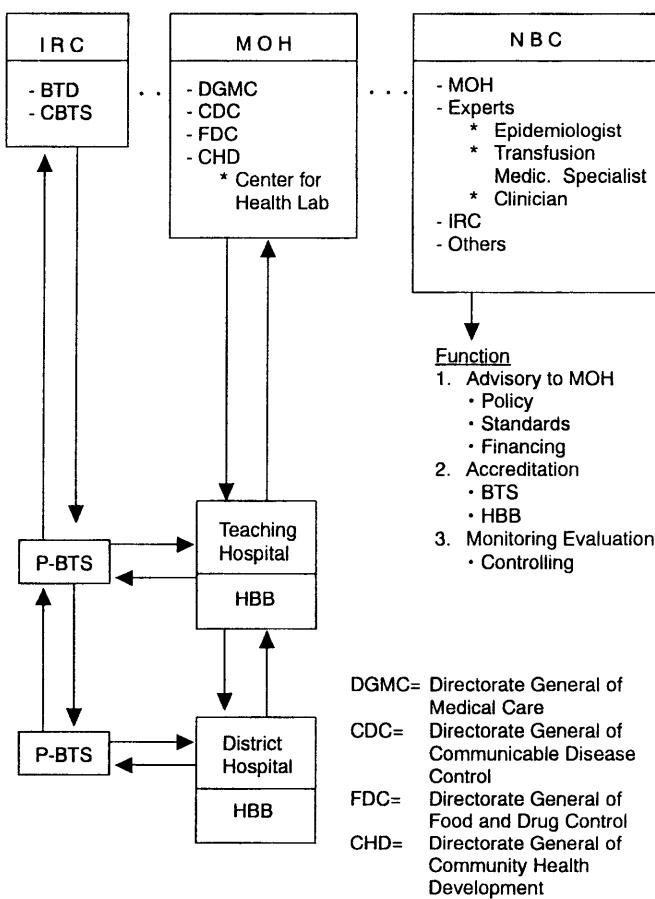
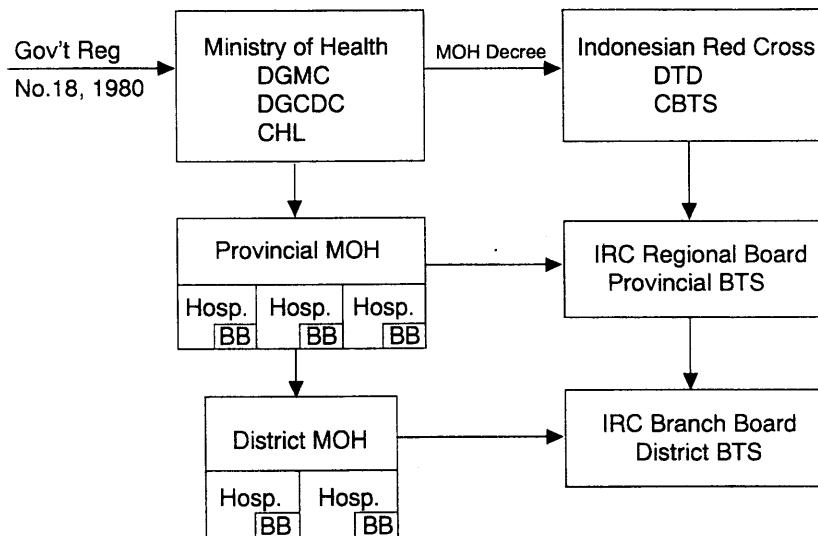


Fig. 1 The coordinated function of blood transfusion services between Department of Health and Indonesian Red Cross Society



**Abbreviations:**

- DGMC= Directorate General of Medical Care
- CDC= Directorate General of Communicable Disease Control
- CHL= Central Health Laboratory
- DTD= Division of Blood Transfusion
- CBTS= Central Blood Transfusion Service
- BTS= Blood Transfusion Service

Fig. 2 Organizational chart of Indonesian Red Cross Society

**Job Description:**

Division of Blood Transfusion(Headquarters):

- Monitoring, supervision and evaluation of BTS in administrative aspect.
- Coordination of overall BTS.

Central Blood Transfusion Service:

- Technical guideline to all BTS.
- Top referral for laboratory screening and testing overall BTS.
- Quality assurance of the whole processing of all BTS.
- Data center.
- Logistic services to all BTS.
- Production of some reagents.

Provincial BTS(Jakarta and Denpasar):

- Donor recruitment and retention.
- Donor selection.
- Blood screening, processing, storage.
- Blood distribution and compatibility testing.
- Referral for technical problem of BTS in the province.
- Supervision to BTS in the province.
- Report to IRC Regional and Division of Blood Transfusion for administrative aspect, and to Central BTS for technical aspect.

Other Provinces where there are no Provincial BTS, the

responsibility to supervise has been taken by Blood Department of the Indonesian Red Cross Regional Chapter.

District BTS:

- Donor recruitment and retention.
- Donor selection.
- Blood screening, processing, storage.
- Blood distribution and compatibility testing.
- Report to Indonesian Red Cross Branch, Regional and Division of Blood.
- Transfusion for administrative aspect, to Central BTS for technical aspect.

Overall there are 1 Central BTS, 2 Provincial BTS, 152 District BTS, 25 pre-BTS, however, the figure of Hospital Blood Banks are only 5% of the total Hospitals in the country, mostly in big cities.

Distribution of BTS is in conformity with health services, of which 56% are located in Java island, while in the very remote area, there are still no BTS due to the incapability of Red Cross Branch to establish the inefficient small BTS, while the locations are quite far from the nearest BTS.

Distribution of BTS is described in Fig. 3.

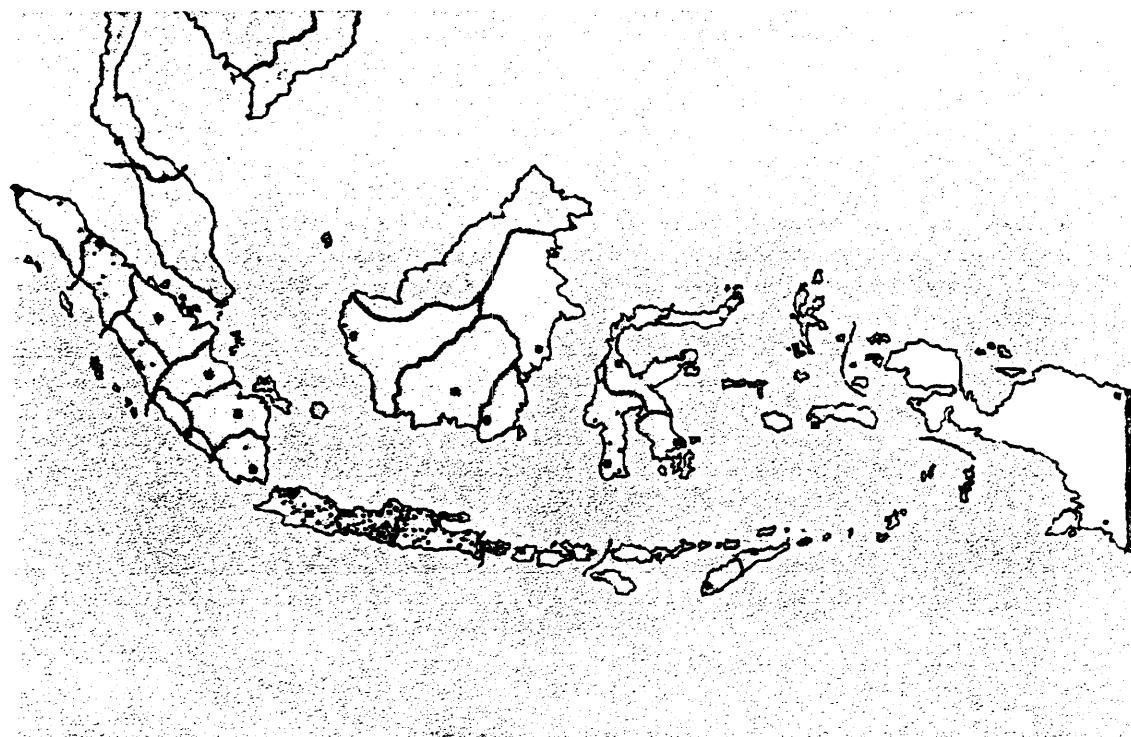


Fig. 3 Distribution of BTS in Indonesia

### Donor recruitment and retention:

Donor recruitment and retention have been done by BTS altogether with Indonesian Red Cross Branch & Regional Chapter, along with the Indonesian Blood Donor Association. Lack of blood due to increasing demand, enforced us to enhance the recruitment activity, and create better coordination with:

- Local government by bringing the activity of blood collection upward. For example, top leaders have a chance to donate their blood.
- Top leaders of religion to include the topic of blood donation as one good deed, in their religion activity.
- University and school institutions, since blood campaign targeting youth is the most essential part to retain the blood collection.
- Various private and public institutions.

The donation rate has increased, from 0.028% to 0.43% in 1996/97, however, our target rate is at least 1% by the year 2000. The figure of blood donation is also converted. 75% of donation was from paid and

25% from replacement in 1969, whereas 77% of donation was from voluntary and 23% from replacement that come from family in 1996/97, with total donation 853,398 units.

Volume of collected blood are 250 mL and 350 mL, and blood containers are single, double, triple and quadruple bags. Apheresis collections are rarely done in Central BTS due to the high cost.

### Blood screening

Bloods are screened towards transmissible diseases. Kinds of screening tests and introductory year are listed below.

- 1972: syphilis by WR, VDRL, RPR
- 1985: Hepatitis B(HBsAg) by RPHA, Macro and Micro ELISA.
- 1992: Anti-HIV by Macro and Micro ELISA, Agglutination and Dot Blot technique, according to the amount of daily blood collection.
- 1995: Anti-HCV screening in big cities(due to the financial limitation).

Table 2 Data of blood screening in Indonesia

Blood Screening towards	Year	Reagents		Results			Total Blood Collection
		RPHA	ELISA	IR(+)* <sup>4</sup>	RR(+)* <sup>5</sup>	WB* <sup>6</sup>	
Hepatitis B (HBsAg)	1995/96	+	+	1-10%			835,821
				3-12.8%			
Syphilis(VDRL/RPR)* <sup>1</sup>	1995/96			0.2-0.6%			835,821
HIV(Anti-HIV1-2)* <sup>2</sup>	1992-97 cumulative	Dipstick	+	1965 (0.057%)	607 (0.018%)	53 (0.0014%)	3,800,439
Hepatitis C(Anti-HCV)* <sup>3</sup>	1995-97	Dipstick	+	0.9-1.9% 1.2-2.5%			352,657 101,773

#### Note:

\*1: Not all BTS do the VDRL/RPR

\*2: HIV screening have been done by using ELISA(45 big centres=70% donation) and agglutination/simple test using Serodia Fujirebio, and HIV Spot Genelabs. From early 1996 some centres started to use Dipstick Entebbe.

\*3: Hepatitis C screening have been taken in:

- Jakarta(since 1995)
- Surabaya(since April 1996)
- Denpasar(since April 1996)
- Bandung(since May 1996)
- Banyuwangi(since January 1996)

The sum of blood collection from those centres reach around 220,000/year==>=40% donation.

\*4: Initial reactive positive(IR(+)) means that if blood was positive in the first examination, the blood was discarded, while the test was continued.

\*5: Repeated positive(RR(+)) from blood sample which was found initially positive, done by Central BTS as Referral Centre for blood testing from BTS.

\*6: Western Blot positive(WB(+)), final confirmation was done by National Reference Lab.

Blood donors have been informed for the testing that would be done, excluding HIV, due to the unlinked anonymous method implemented toward HIV testing. Pilot Project for confidential HIV Screening with pre and post counseling has been taken in Jakarta -BTS since April 1997.

#### Blood processing

There are 15 big BTS performing the component preparation by refrigerated centrifugation, while others can only perform Packed Red Cells by manual sedimentation and gravitation. National figure of components processing is 33%, while Jakarta BTS have already prepared 90% of components, Surabaya has done 63%.

#### Blood storage and distribution

Blood has been kept in single, double, triple and quadruple bags with CPD-A and stored in 4°C for red cells, for 35 days, 22°C for platelets, for 5 days, and -35°C for FFP and Cryoprecipitate for 1 year.

Blood compatibility testing has been done in form of three phases crossmatching, referral screening and identification of antibody by CBTS for incompatibility cases.

#### Financial resources

Service costs have been drawn from the patient on average USD 5-10 per single bag.

#### Statement of problem

- Lack of blood especially in the very remote area is the very important point to be solved, for diminishing the Maternal Mortality due to post delivery bleeding, as well as for overcoming the acute emergency cases.

- Lack of blood storage in the hospital makes another difficult situation to make the availability and accessibility of blood demand.
- Incomplete blood screening especially for Hepatitis C in the remote areas due to financial limitation is another constraint to provide safe blood.

#### Problem solving

- The most important point is increasing awareness of every institution involved that we should overcome the problem together, and it is not the sole Red Cross problem.
- Availability and accessibility of blood should be initiated by all institutions concerned, especially Department of Health.
- The use of artificial oxygen carriers to prevent bleeding <1,200 ml will be very helpful for temporary remedies in the remote areas where there is no blood storage, while for larger amount of hemorrhage, oxygen carriers can be combined with other indicated blood products.
- It is also important to consider the price, especially for low income people; however, private hospitals can still consider to use it for certain people.

#### Conclusion

- Blood Program in Indonesia, as developing country, has already developed despite of certain difficulties due to the financial limitation.
- The use of artificial blood can be considered especially in private hospitals in big cities. While it is important to be used in remote areas as temporary remedies, it should be carefully selected due to the high unaffordable price for low income people.

# 炭酸ガスによりpHを制御したヘモグロビン小胞体の ヘモグロビン酸化挙動

朴 晟翼, 濱崎将臣, 吉林智一, 武岡真司, 西出宏之, 土田英俊\*

## pH-control of Hemoglobin Solution by CO<sub>2</sub> Gas and Hemoglobin Oxidation of Hemoglobin Vesicles

Sung Ick Park, Masaomi Hamasaki, Tomokazu Kobayashi,  
Shinji Takeoka, Hiroyuki Nishide, Eishun Tsuchida\*

高濃度の精製ヘモグロビン(Hb)をリン脂質二分子膜小胞体中に内包させたヘモグロビン小胞体(HbV)の酸素輸送能を高めるために、HbV調製時においてHb溶液のpHを7.0に調節してHb内包効率を高め、酸素運搬体として機能させるときは内水相pHを7.4に調節しHbの酸化(メト化)の進行を抑制した。このpH制御は、CO<sub>2</sub>分圧とHb溶液のpHとの関係、及びCO<sub>2</sub>が二分子膜を自由に透過する性質を利用して行い、予めpH7.4に調節したHb溶液のpHをCO<sub>2</sub>によって7.0に低下させてHbVを調節、脱CO<sub>2</sub>によってHbV内水相のpHを7.4に戻した。このpH制御HbVは[Hb]/[Lipid]比が1.9と高く、37℃、12時間後のメト化率の増加は10%程度、*in vivo*では36%程度であった。

In order to improve the oxygen transporting ability of Hemoglobin Vesicles (HbV), which encapsulate the concentrated Hb with phospholipid bilayer membrane, the pH of HbV was adjusted to 7.0 to increase the Hb encapsulation efficiency, and then the pH of the HbV was adjusted to 7.4 when it functions as an oxygen carrier. This pH control was achieved by utilizing the relationship between the CO<sub>2</sub> partial pressure and the pH value of the Hb solution and the high permeability of CO<sub>2</sub> through the bilayer membrane. The pH value of 7.4 in the Hb solution was decreased to 7.0 by dissolving CO<sub>2</sub>, and HbV was prepared using the Hb solution. The pH value of the interior of the HbV was returned to 7.4 by removing the dissolving CO<sub>2</sub>. The resulting pH-controlled HbV showed an [Hb]/[Lipid] ratio as high as 1.9 and the increase of metHb percentage was 10% after 12hr at 37℃ and 36% *in vivo* test.

### 1. 緒言

分子集合体であるヘモグロビン小胞体(HbV)は、リン脂質二分子膜間、リン脂質分子—Hb分子間の相互作用を水相のpH、イオン強度、温度などを制御することによって調製される<sup>1)</sup>。HbVの酸素運搬能の向上には、1)小胞体内包ヘモグロビン濃度を増大させ、また小胞体を構成する二分子膜層数を減少させることにより脂質量に対するヘモグロビン量([Hb]/[Lipid]比)を増大させる、2)内包ヘモグロビンの化学的安定化、すなわち、ヘモグロビンの酸化(以下メト化と略)の抑制、3)ヘモグロビンの酸素親和度は赤血球に類似させて27 Torr付近に調節することが重要となる。

1)に関してはHb溶液中に脂質を水和させて小胞体を調製する際、溶液のpHをHbの等電点付近(7.02)の7.0に制御することが最

適とされ<sup>1)</sup>、また、2)に関してはpHが低くなるとプロトン酸化によりメト化が起こり易くなるためpHは高い方が望ましい。また3)に関してはpHが低い程ヘモグロビンの酸素親和度は低下して酸素を放出し易くなるので、生理的pHであるpH7.4が適当と考えられた。従って、HbV調製時のHb溶液のpHは7.0、酸素運搬体として機能させる際には内水相のpHを7.4に制御できれば酸素運搬能の大幅な向上が見込まれる。しかしながら一般的に小胞体の内水相のpHは外水相のpHを変化させるだけでは制御できない。これは内外両水相を分けている二分子膜のイオン透過度が低いためである。例えば、H<sup>+</sup>とOH<sup>-</sup>の透過係数は1.4×10<sup>-4</sup> cm/sでありイオンの透過係数としては非常に大きい値であるが、Na<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>の透過係数は各々10<sup>-13</sup> cm/sと10<sup>-11</sup> cm/s程度に留まる<sup>2)</sup>。従って、H<sup>+</sup>、OH<sup>-</sup>の二分子膜の透過度が比較的高い場合でも、H<sup>+</sup>の対アニオンやOH<sup>-</sup>の対カチオンの透過速度が低いのでイオン透過によるpH制御は困難である。

一方、CO<sub>2</sub>は一定温度においてヘンリー則によりCO<sub>2</sub>分圧に比例して水に溶解し、pHを低下させる。また溶存CO<sub>2</sub>を減圧脱気す

\*To whom all correspondence should be addressed.

早稲田大学理工学総合研究センター高分子化学研究室、〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1, Department of Polymer Chemistry, ARISE, Waseda University, Ohkubo 3-4-1, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan.  
論文受付1998年3月4日、受理1998年6月4日。

ればpHはCO<sub>2</sub>溶解前の値に戻る。そこで、pH 7.4に調節したHb溶液にCO<sub>2</sub>を溶解させてpHを7.0に低下させた状態でHbVを調製し、その後CO<sub>2</sub>を減圧脱気してpHを7.4に戻す方法により、上記の目的が達成されると考えられる。

本論文ではHb溶液のpHをCO<sub>2</sub>分圧により制御する方法を確立すると共に、小胞体の内水相がCO<sub>2</sub>で調節できることを確認して、[Hb]/[Lipid]比が高くメト化速度が低い高性能HbVを調製することを目的とした<sup>3)</sup>。

## 2. 実験方法

### 2.1. 小胞体内水相のpH測定方法<sup>4,5)</sup>

CO<sub>2</sub>によるHbV内水相のpH調節を確認するため、蛍光物質であるピラニン(8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate)をpH指示薬として用いた。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に対しピラニンを0.5 mMとなるよう溶解し、これに日本精化社製の混合脂質プレソームPPG-I(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン、コレステロール、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルグリセリール=5/5/1、モル比)に混合し([Lipid]=1.5 g/dL)、ピラニン内包小胞体を調製した。ピラニン蛍光スペクトルから内水相pHを算出した。

### 2.2. CO<sub>2</sub>を用いてpH調節したHbVの調製

精製HbCO溶液([Hb]=38 g/dL, [Pyridoxal-5,-phosphate]=18mM, [Homocysteine]=5mM)<sup>6)</sup>のpHを炭酸ナトリウムにて7.4に調節し、ガスブレンダーを用いて調節したP<sub>CO<sub>2</sub></sub>=130 TorrのCO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>混合ガスをHb溶液に溶解させ、4°Cにて溶液のpHを7.0に調節した。HbVの膜成分には、日本精化社製のプレソームPPG-I 脂質と0.9mol%のα-トコフェロール(Merck社、米国)を混合して用いた。pHを調節したHb溶液中に混合脂質を分散させて小胞体を形成させた後、pHを7.4に調節し4°Cで水和を行った。エクストルージョンにてpHを7.0に維持しながら小胞体の粒径を約250nmに制御した<sup>7)</sup>。減圧操作で溶存CO<sub>2</sub>を除去してpHを7.4に戻し、超遠心分離(50,000×g, 40min)にて未内包のHbを除去した。ポリエチレングリコール(PEG)鎖の平均分子量が約5000であるPEG脂質(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン-N-(ポリエチレングリコール))(PEG-DPPE, Avanti社、米国)0.16mM水溶液を外表面膜に対して0.37mol%になる様にHbV分散液に添加し、CO<sub>2</sub>雰囲気下37°Cにて30分間攪拌を行ってPEG-DPPEをHbVの外表面に導入した<sup>8,9)</sup>。未導入のPEG脂質は超遠心分離(50,000×g, 40min)により上澄を除去した後、酸素雰囲気下での可視光照射によりHbCOをHbO<sub>2</sub>とし、リン酸緩衝生理食塩水に分散させHbV分散液を調製した<sup>10)</sup>。

### 2.3. *in vitro*と*in vivo*でのHbVのメト化率測定

*in vitro*におけるメト化率の推移は、HbV([Hb]=10 g/dL, pH 7.4)を37°Cにて静置し、可視スペクトルの変化より測定した<sup>11)</sup>。Wister系ラット(360±13g)を用いた*in vivo*でのHbVのメト化率測定では、全血(58mL/kg)の20%に相当するHbVをラットの静脈内に投与した([Hb]=10 g/dL, pH 7.4 in PBS)。このラットから経時にヘパリン加シリジンで採血を行い、ヘマトクリット管に採取した。この血液について遠心分離(1,900×g, 5min)を行い、上澄液

に存在するHbVのメト化率を測定した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1. HbVの内包効率([Hb]/[Lipid])、メト化とpHの関係

異なるpHのHb溶液からHbVを調製し、得られたHbVの性能とpHとの関係を検討するため、精製濃縮HbCO溶液([Hb]=38 g/dL, [PLP]=18mM, [Hcy]=5mM)のpHを炭酸ナトリウム溶液の添加により6.8から7.4に調節し、混合脂質をこの溶液に分散させた。得られた小胞体分散液をエクストルージョン法を用いて約250 nmに粒径を制御し、さらに超遠心分離(50,000×g, 40min)で未内包のHbを除去し、酸素気流下で可視光照射を行い、内包HbCOをHbO<sub>2</sub>とした。HbVはリン酸緩衝生理食塩水にてHb濃度が10g/dLとなるように分散させた。図1にHbVの[Hb]/[Lipid]比、37°Cでのメト化速度、酸素親和度と溶液pHとの関係を示す。

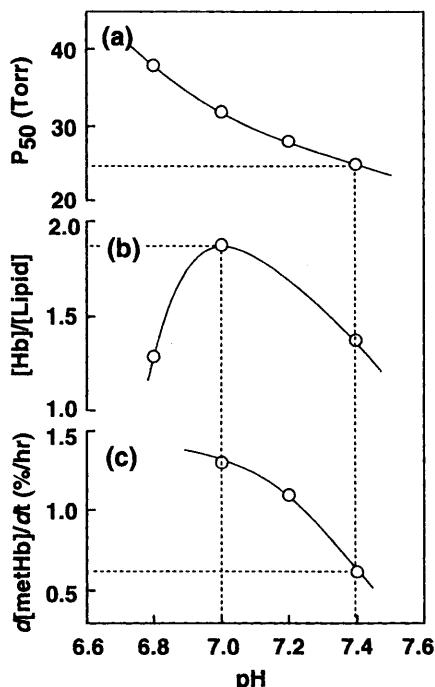


Fig. 1 Influence of pH of the Hb solution on (a) P<sub>50</sub> of the HbV, (b) [Hb]/[Lipid] ratio of the HbV, and (c) metHb formation rate of the HbV.

pH 7.0のHb溶液から調製したHbVでは[Hb]/[Lipid]比は1.9であり、pH 7.4の1.3と比較して高かった(図1(b))。これはHb溶液のpHがHbの等電点(pI=7.02, 25°C)より高いため、すなわちHbのδ電位が負になると負電荷を持つ二分子膜表面とHbとの静電反発が大きくなるため、Hbが内包されにくくなるものと考えられる。またHb溶液のpHが低いと水和時に二分子膜表面間の静電反発が減少するため、二分子膜の剥離が起こりにくくなることから多重層小胞体となって[Hb]/[Lipid]比が低下するものと考えられる<sup>11)</sup>。一方、HbVのメト化速度は内水相のpHが7.0よりもpH 7.4の方が

低かった(図1(c))。従って、pH7.0でHbを脂質二分子膜に内包させ、小胞体形成後pH 7.4に調節できれば低いメト化速度と高い[Hb]/[Lipid]比を併せ持つHbVが得られる。

### 3.2. CO<sub>2</sub>分圧制御による内水相のpH制御

0.5 mMのピラニンを小胞体の内水相に内包させ、一定のCO<sub>2</sub>分圧のCO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>混合気体を溶解させたところ、ピラニンの蛍光スペクトルは瞬時に変化し、蛍光強度比から算出した内水相pH値は通常のpH電極で測定した外水相のpH値と良い一致を示した(図2)。

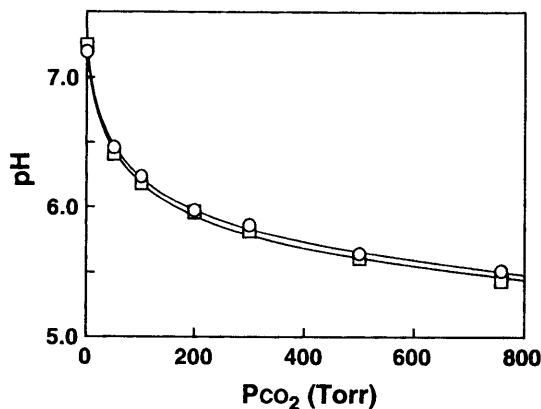


Fig. 2 Influence of Pco<sub>2</sub> on the inner or outer phase pH of the vesicle.  
○:inner phase pH measured by using pyranine, □:the outer phase pH which measured by a pH electrode.

他方、1N塩酸溶液を添加して外水相のpHを7.3から5.8まで低下させても内水相のpHは添加直後に6.9まで低下した後、12時間後においても変化は認められなかった。従って、Cl<sup>-</sup>などのイオンは小胞体二分子膜を透過しにくいが、CO<sub>2</sub>のような溶存気体は自由に透過することができ、CO<sub>2</sub>分圧を変化させた気体の溶解により内水相pHを容易に制御できることを確認した。

### 3.3. CO<sub>2</sub>を用いたHb溶液のpH制御

pHに対して緩衝作用を示さない純水や生理食塩水におけるCO<sub>2</sub>分圧とpHとの関係は37°Cにおいて

$$pH = 4.9 - 0.5\log(P_{CO_2}) \quad (式1)$$

で表わされる。

しかしながら、Hb溶液では、CO<sub>2</sub>溶解によるpH低下に対して緩衝作用を示すため、あらかじめHb濃度の影響を調べておく必要がある。任意のHb濃度におけるCO<sub>2</sub>分圧とHb溶液のpHとの関係(37°C)から式(2)を求めた。

$$pH = 7.94 + 0.36\log[Hb] - (0.856 - 0.148\log[Hb])\log(P_{CO_2}) \quad (式2)$$

次に、温度t(°C)の影響を調べるために、Hb濃度を38 g/dLに固定し各温度におけるHb溶液のpHとCO<sub>2</sub>との関係を求める、式(3)に表した。

$$pH = (20.4 - 0.025t) - (0.85 - 0.005t)\log(P_{CO_2}) \quad (式3)$$

以上の式を用いて任意の温度とHb濃度におけるHb溶液のpHをCO<sub>2</sub>分圧にて調節できることが可能となった。

### 3.4. HbVの物性とメト化率の推移

表1に、pH7.4のHb溶液にCO<sub>2</sub>を溶解させてpHを7.0に調節して調製したHbV(HbV-1)の性能を、pH7.4 (HbV-2)あるいはpH7.0 (HbV-3)のHb溶液から調製したHbVと比較した。HbV-1の[Hb]/[Lipid]比は1.9で、HbV-3の[Hb]/[Lipid]比と同値を有し、HbV-2の値1.3より高い値を示した。また、酸素親和度(P<sub>50</sub>)はHbV-2と同じ値を示した。

Table 1 Characteristics of HbVs

parameter	the inner aqueous phase pH		
	HbV-1 <sup>1)</sup>	HbV-2 <sup>2)</sup>	HbV-3
diameter(nm)	266±90	243±71	261±80
[Hb](g/dL)	10.0	10.0	10.0
[Hb]/[Lipid]	1.9	1.3	1.9
[metHb](%)	3.0	2.2	2.4
P <sub>50</sub> (Torr)	25	24	32
OTE(%)	28	27	35
Hill coefficient	2.0	2.0	2.1
the inner aqueous pH(37°C)	7.4	7.4	7.0
the outer aqueous pH(37°C)	7.4	7.4	7.4

1) pH7.4 of Hb solution was decreased to pH7.0 by dissolving CO<sub>2</sub>, and HbV was prepared.

2) pH7.4 of Hb solution was used, and HbV was prepared.

また、HbV-1とHbV-3のメト化速度をin vitro.とin vivo.で測定した(図3)。HbV-1では、in vitro.系でのメト化率の推移は12時間後で12%となり、HbV-3(12時間で約24%)の半分に抑制された。また、興味深いことにin vivo.系ではin vitro.系よりもメト化速度は大きくなり、HbV-1をラット静脈に注入し12時間後のメト化率は36%で、HbV-3では8時間で50%以上となった。in vivo.におけるメト化速度の増大は生体系(血管内皮)で発生したNOや活性酸素による影響の可能性が考えられ、これらの消去系の共封入が必要と思われた。

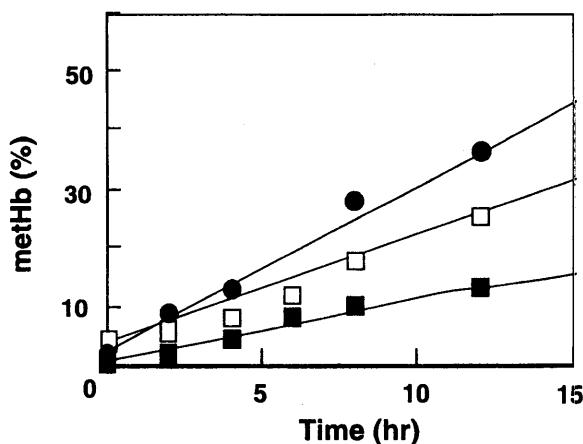


Fig. 3 Time courses of metHb formation in HbV.  
*in vitro.* at  $\text{PO}_2=149\text{ Torr}$ ,  $37^\circ\text{C}$ : (■):HbV-1, (□):HbV-3,  
*in vivo.*: (●):HbV-1, (○):HbV-3.

#### 4. 結論

$\text{CO}_2$ にてHb溶液のpHを7.0に調節してHb小胞体を調製し、さらに内水相のpHを7.4に調節することにより高いHb内包効率を有し、かつ適度な酸素親和度、低メト化速度のHb小胞体が得られた。

#### 謝辞

本研究の一部は、厚生科学研究費補助金高度先端医療研究事業(人工血液開発研究分野)によって行われた。記して謝意を表する。

#### 参考文献

1. 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.
2. Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K. *Molecular Biology of the Cell*. Watson JD, ed. Garland Publishing Inc. 1983;287.
3. Park SI, Kose T, Hamasaki M, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. Effects of the pH-controlled hemoglobin vesicles by  $\text{CO}_2$  gas. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1998; 26:in press.
4. Kano K, Fendler JH. Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surface. *Biochim Biophys Acta* 1978;509:289-99.
5. Clement NR, Gould JM. Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetri-sulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1981;20: 1534-8.
6. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. *Protein Expr Purif* 1993;4:563-9.
7. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys Acta* 1985;812:55-65.
8. Sakai H, Takeoka S, Park S I, Kose T, Nishide H, Izumi Y, Yoshizuka A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface-modification of hemoglobin vesicles with poly(ethyleneglycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* 1997;8:23-30.
9. 朴 崇翼, 宗慶太郎, 酒井宏水, 武岡真司, 西出宏之, 土田英俊. ポリエチレングリコール型脂質および糖脂質によるヘモグロビン小胞体(HbV)の表面修飾効果. *人工血液* 1996;4:9-13.
10. Collman JP, Brauman JI, Iverson BL, Sessler JL, Morris RM, Gibson QH.  $\text{O}_2$  and CO binding to iron(II) porphyrins: A comparison of the "Picket Fence" and "Pocket" porphyrins. *J Am Chem Soc* 1983;105: 3052-3064.
11. 濱田健一, 巨勢丈裕, 大串建, 酒井宏水, 武岡真司, 西出宏之, 土田英俊. ヘモグロビン, コレステロール, リン脂質, polyethylene glycol脂質, メトヘモグロビンの定量. *人工血液* 1995;3:96-101.

## 海外文献紹介

# Clinical Utility of Human Polymerized Hemoglobin as a Blood Substitute after Acute Trauma and Urgent Surgery (急性期外傷および緊急手術後における血液代替物としてのヒト重合ヘモグロビンの臨床的有効性について)

Gould SA, Moore EE, Moore FA, Haenel JB, Burch JM, Sehgal H, Sehgal L, DeWoskin R, Moss GS.  
The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care 1997;43:325-32.

慶應義塾大学医学部外科 渡辺 真純

蘇生を目的とした酸素運搬体溶液には次のようなことが求められている。容量負荷による効果と酸素運搬能を同時に兼ね備え、どんな症例にも迅速に使用でき、血管作動性・病原体伝搬性がなく、長期保存可能などである。これまでに報告してきた可溶性4量体ヘモグロビン(いわゆるストローマフリーへモグロビン)では血管収縮や腎障害などいくつかの副作用が認められている。そこで今回は修飾ヘモグロビンである Human polymerized hemoglobin (Poly SFH-P) の治療上の有効性を調べるためにFDAの許可を得て臨床第1相、第2相試験を行った。

### Material and Methods

#### Description of Hemoglobin Solution

Poly SFH-Pはヒト4量体ヘモグロビンをグルタールアルデヒドにより重合させたもので滅菌可能、等張、等膠質浸透圧であり、Hb濃度10g/dL、 $P_{50}$  28~30 Torr、血中半減期24時間に調整されている。その1単位は50gのPoly SFH-Pを含有した500mLの溶液である。

#### Experimental Protocol

18歳以上の男女で急性期外傷または手術中の失血によるヘモグロビン低下、収縮期血圧低下(100mmHg以下)をきたし緊急輸血が必要と判定された症例を対象と

慶應義塾大学医学部外科、〒160-8582 東京都新宿区信濃町35、Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, 35-Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.

した。頭部外傷症例、妊婦などは除外した。臨床的に輸血が必要と判断された時点で同種血輸血の代わりにPoly SFH-Pを投与した。最初の10例は1単位のPoly SFH-Pを次の20例は3単位までを最後の9例は6単位までを使用した。上に示した最大量投与後は必要であれば同種血輸血を行った。

#### Measurements

血液サンプルを投与前、投与直後、12時間後、1日後、2日後、3日後に採取した。バイタルサインのチェックの他、肝機能検査(AST, ALT, ピリルビン)、腎機能検査(クレアチニクリアランス、クレアチニン)、ヘマトクリット、総ヘモグロビン濃度、赤血球ヘモグロビン濃度、血清ヘモグロビン濃度を測定した。また、Poly SFH-P投与後は動脈、静脈より採血し、酸素含量などを算出した。

#### Results

39症例、男性28例、女性11例、年齢19から83歳にPoly SFH-Pを投与した。11例は外傷、17例は大動脈瘤、肝切除などの外傷に関連しない予定手術症例であった。

#### Poly SFH-P Infusion

投与速度は症例の緊急性に応じて1単位175分から6単位20分の範囲となった。Poly SFH-Pの投与量は1単位14例、2単位2例、3単位15例、6単位8例であった。3例で血圧の動搖、冷感などを訴えたが、ひ

き続き行った他の血液製剤投与後でも同様の訴えがあった。Poly SFH-Pに関連した副作用は明らかでなかった。

#### Hemoglobin Data

1単位のPoly SFH-P投与により血漿中のヘモグロビン濃度は約1g/dL上昇しており、赤血球ヘモグロビン濃度の低下にもかかわらず総ヘモグロビンの低下はわずかであった。

#### Oxygen Utility

Poly SFH-P投与後の動脈血酸素含量較差は赤血球によるもの $2.7 \pm 2.2\%$ 、Poly SFH-Pによるもの $1.2 \pm 0.9\%$ で、酸素利用率(動脈血酸素含量較差/動脈血酸素含量)はそれぞれ $27 \pm 16\%$ 、 $37 \pm 13\%$ でありPoly SFH-Pによるものが有意に増加していた( $p<0.05$ )。

#### Safety

投与後3日目までの体温、平均動脈圧、心拍数、クレアチニクリアランスに有意な変化はなくPoly SFH-Pに血管作動性はみられなかった。その他、投与後1日目にASTの軽度上昇(投与前 $33 \pm 29$ U/L、投与後1日目 $60 \pm 39$ U/L)、投与後3日までのピリルビン値の上昇(投与前 $0.7 \pm 0.8$ mg/dL、投与後3日目 $2.9 \pm 5.4$ mg/dL)がみられた。

#### Blood Utilization

Poly SFH-P投与後の24時間で同種血輸血を必要としなかったのは39例中23例(59%)で同種血輸血施行例でその使用量は1単位

1例、2単位3例、3単位3例、5単位1例、6単位2例、6単位以上6例であった。

### Discussion

このレポートは急性期外傷および手術時における血液代替物としてのヒト重合ヘモグロビンの臨床的有効性を初めて評価したものである。

これまでに健常ボランティアに対する1単位のPoly SFH-P投与で発熱、腎障害、肝障害、血管収縮などの副作用がないことを報告した。今回の臨床試験では出血のある症例に6単位までのPoly SFH-Pを投与したが副作用は認められなかつた。ヘモグロビン分子を重合し、修飾されていない4量体分子を除去したことが有効であったと考えている。

現在のところ血液代替物質の有効性を評価する方法について明確な基準はない。NIHが示すコンセンサスでは、急性失血時の輸血の適応は通常ヘモグロビン濃度7g/dL以下であり、10g/dL以上ではまず適応はない。7~10g/dLでは臨床的に虚血の状態を評価し患者の状況に応じて決定すべきであるとしている。本研究においてもこのコンセンサスに基づきPoly SFH-Pの投与を行い有効性を評価した。酸素運搬体としての基本的な機能として酸素を運搬し放出する能力は不可欠であるが、それは動脈血酸素含量、動静脈血酸素含

量較差、酸素利用率として定量的に表すことができる。血漿中のPoly SFH-Pは全血から遠心分離することにより赤血球とは別に定量的に評価が可能であり、上記の指標をそれぞれ測定した。1単位のPoly SFH-P投与によりおよそ1g/dLのヘモグロビンが上昇した。また、出血に際して赤血球のヘモグロビンは大幅に下降したが、Poly SFH-Pのヘモグロビンにより総ヘモグロビン濃度は保たれていた。Poly SFH-Pの酸素利用率も赤血球の利用率より有意に高値であり生理的に有効に機能していると考えられた。また、24時間以内にPoly SFH-Pのみを投与した症例が59%あり、急性出血時の同種血輸血を減らすという意味で有効であったと考える。

まとめると、Poly SFH-Pは急性出血に際して赤血球に代わって血中ヘモグロビン濃度を維持しており、有効に酸素を運搬、放出していた。そして同種血輸血量を減少することができたことから、臨床的に有効な血液代替物といえる。

### 訳者のコメント

今回、新しく開発された人工酸素運搬体の臨床治験についての報告があったのでとりあげてみた。このレポートは血液代替物としてのヒト重合ヘモグロビンを出血の急性期に使用し臨床的にその有効性を示したものである。これまでにフル

オロカーボンやストローマフリーへモグロビンの臨床的使用例は報告されているが、いわゆるModified Hemoglobinの臨床試験としては最初のレポートであり注目される。39例のnonrandomized studyであるが、通常のcriteriaで輸血が必要となった時点でヒト重合ヘモグロビンを投与し、そのうち59%の症例で24時間以内の同種血輸血が不要であったことは血液代替物としての有効性を示したといえる。

一方、問題点として、方法論的にはnonrandomized studyであること、動静脈血酸素含量較差、酸素利用率などを算出する際に混合静脈血でなく末梢静脈血よりえられたサンプルを用いていることなどがあげられる。また、出血後24時間以内の同種血輸血使用についてのみ評価されていること、投与後4日目以降の患者の状態、予後について触れられていないことなどの問題もある。現在、米国において投与上限を10単位とした大規模なrandomized controlled studyが進行中とのことでその結果が報告されるのを待ちたい。

現在のところ、わが国では人工酸素運搬体の臨床治験は行われていない。わが国独自に開発されているリポソーム型血液代替物などが近い将来、臨床の場で使用できることを期待している。

—ヒト エリスロボエチン製剤—

**エスパー<sup>®</sup> 皮下用**

6000・9000・12000・24000

(劇)(指)(要指) 一般名:エポエチンアルファ(遺伝子組換え)

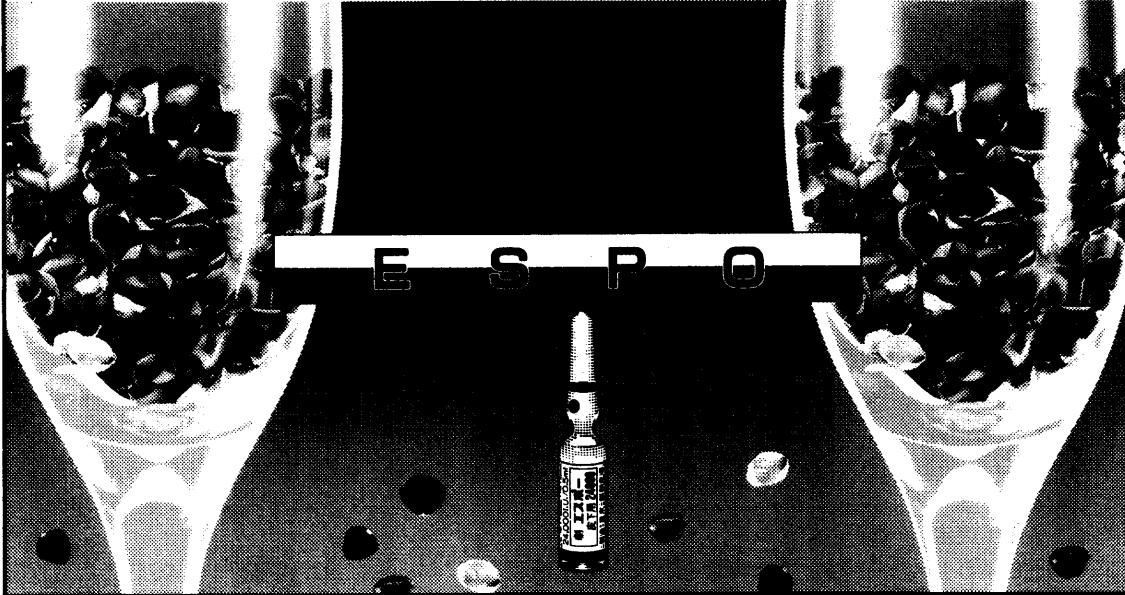


●効能・効果 一括料一

①貯血量が800ml以上で  
1週間以上の貯血期間を  
予定する手術施行患者の  
自己血貯血

用法・用量、及び使用上の注意等は添付文書をご覧下さい。

三共株式会社・ 製造元  
千葉県 東京都中央区日本橋本町二丁目  
千葉県 東京都中央区新川二十一丁目





日本赤十字社の血漿分画製剤は、善意の献血から創られています。

平成9年度 東京都内小・中学生「献血の絵」 小学生高学年の部・金賞

大田区立入新井第四小学校6年 矢嶋 万由奈

日本赤十字社の  
血漿分画製剤

捐 クロスエイトM250 捐 クロスエイトM500 捐 クロスエイトM1000

捐 赤十字アルブミン

日本赤十字社 〒105-8521 東京都港区芝大門1-1-3

文献請求先

日本赤十字社中央血液センター医薬情報部

〒150-0012 東京都渋谷区広尾4-1-31 TEL.03-5485-6607

## 投稿規定 Short Version

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広くを集めます。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

### 執筆規定

DTP (Macintosh)による編集作業によって作製するため、ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー2部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。Macintosh以外を用いるときは、テキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。

- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords (英文で6個程度) を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
- 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μm, L, mL, μL, mol, g, mg, μg, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
- 8) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では2), 3-5), 1, 4-6)などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名、論文題名、誌名、西暦発行年；巻数：

頁～頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicusに準拠する。単行本の場合は全著者名、題名、編集者名、書名、発行地：発行書店、年号；頁～頁。の順とする。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三、岩本 清. リポソームの調製. 野島庄七、砂本順三、井上圭三 編. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ版権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを超える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円)。カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

### 編集委員会

●池淵研二（委員長）、薄場 彰、武岡真司、友田燁夫、西出宏之、宮尾秀樹、山内紘一、渡辺真純●

### 日本血液代替物学会 会誌

■発行 日本血液代替物学会

■編集・制作「人工血液」編集委員会

■印刷 株式会社 高山

### 人工血液 vol. 6 (2) 1998年6月30日発行

〒169-8555 東京都新宿区大久保3

早稲田大学理工学総合研究センター55S棟701号

TEL (03)5286-3120 FAX (03)3205-4740

〒063-0002 札幌市西区山の手2条2丁目

北海道赤十字血液センター内

TEL (011)613-6615 FAX (011)613-4131

〒113-0034 東京都文京区湯島1丁目1番地12号

TEL (03)3253-5311 FAX (03)3251-5339

再生紙を使用