

## 目 次

# 人工血液

第8巻 第2号 2000年7月

総説	Mechanical, Microvascular and Cellular Basis for the Design of Artificial Blood .....	Amy G. Tsai	30
	ヘム分解の生化学から見た人工酸素運搬体の設計戦略 …	末松 誠	40
	バーフルオロカーボン(PFC):第2世代PFCによる挑戦 ……	仲井邦彦	43
連載・論文紹介			
	「Perflubron乳剤投与で整形手術における輸血投与を遅延させることができる」論文に対する論評 .....	青木克憲	52
海外文献紹介			
	リポソーム内包型ヘモグロビンによる補体を介した急性反応 .....	池淵研二	55

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 8 No. 2 July, 2000

## Contents

Review:	Mechanical, Microvascular and Cellular Basis for the Design of Artificial Blood .....	Amy G. Tsai	30
	Optimal Design of Hemoglobin-Based Blood Substitutes with Reference to Heme Catabolism In Vivo .....	Makoto Suematsu	40
	Perfluorocarbon (PFC): Challenge with the Second-Generation PFC .....	Kunihiko Nakai	43
Topics:	Comments on “Perflubron Emulsion Delays Blood Transfusions in Orthopedic Surgery” .....	Katsunori Aoki	52
	Complement-Mediated Acute Effects of Liposome-Encapsulated Hemoglobin .....	Kenji Ikebuchi	55

# 第7回日本血液代替物学会年次大会会告

- テー マ： 血液代替物臨床応用への戦略
- 大 会 長： 北畠 顯（北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学）
- 会 期： 2000年9月7日（木）， 8日（金）
- 開催場所： ☎060-0002 北海道札幌市中央区北2条西7丁目 かでる2・7
- プログラム：（予定）

9月7日（木）————

9:00～ 開会式、大会長挨拶

- 9:15～ ■会長シンポジウム  
「血液代替物開発研究Update, 2000」
- 1. 酸素輸液開発の現況  
武岡真司 早稲田大学理工学総合研究センター
  - 2. 人工酸素運搬体（仮題）  
仲井邦彦 東北大学医学系研究科環境保健学
  - 3. 血小板代替物（仮題）  
西谷孝子, 村田 満 慶應義塾大学医学部内科
  - 4. 遺伝子組換えヒト血清アルブミン（仮題）  
小林 薫 ウエルファイド（株）創薬研究所
  - 5. 遺伝子組換えヒト抗体（仮題）  
黒澤良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学

11:00～ ■一般演題

- 12:00～ 理事会  
12:30～ 評議員会  
13:00～ 総会

- 13:15～ ■特別講演 1  
「わが国における血液代替物研究」  
土田英俊 早稲田大学理工学総合研究センター

14:00～ ■一般演題

- 15:15～ ■教育講演  
「血小板輸血の課題と代替物研究」（仮題）  
池田康夫 慶應義塾大学医学部内科

16:00~ ■特別講演 2

「Current Status of Blood Substitute Research: Impact of Recent Scientific Discoveries」

Robert M. Winslow

Sangart, Inc.

18:00~ 懇親会 札幌ガーデンパレス

9月8日（金）————

9:00~ ■シンポジウム

「新たな人工酸素運搬体とその臨床応用」

1. ショック病態におけるリポソーム封入型ヘモグロビンの生体内自動酸化と分解のメカニズム  
末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学

2. 新たなヘモグロビン修飾体（仮題）  
西 勝英 熊本大学医学部薬理学

3. 新たなパーフルオロケミカルエマルジョン（仮題）  
福島昭二 神戸学院大学薬学部製剤学

4. SNO-PEG-Hbの虚血心筋への応用（仮題）  
北風政史 大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学

5. 人工酸素運搬体の臓器移植への応用（仮題）  
藤堂 省 北海道大学大学院医学研究科移植外科学

11:00~ ■一般演題

12:00~ 昼食

13:00~ ■ワークショップ 1

「海外における人工血液開発とわが国へのフィードバック」

「Blood Substitute Development in Foreign Countries and Its Feedback to Japan」

1. Clinical Studies Using PHP（仮題）

Joseph DeAngelo Apex Bioscience, Inc.

2. Clinical Applications of Modified Hemoglobin（仮題）

Christopher T. Privalle Apex Bioscience, Inc.

3. Development Status of Oxygent<sup>TM</sup> (Perflubron Emulsion)

—An Intravenous Oxygen Carrier For Use as a Temporary Red Cell Substitute in Elective Surgery

Peter E. Keipert Alliance Pharmaceutical Corp.

- 15:00~ ■ワークショップ 2  
「人工血液臨床応用をとりまく問題点と対策」
1. 患者の立場から  
金森寿憲, 中井猛之 エホバの証人
  2. 臨床の立場から  
堀之内宏久 慶應義塾大学医学部外科
  3. 血液事業の立場から  
池淵研二 北海道赤十字血液センター
  4. 開発企業の立場から  
緒方嘉貴 テルモ株式会社
  5. 総括  
高折益彦 岡山県赤十字血液センター

学会事務局： 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

担当 佐久間一郎

秘書 村井 雅奈子

TEL: 011-716-1161内線6973 FAX: 011-706-7874

e-mail: [cvaspr@med.hokudai.ac.jp](mailto:cvaspr@med.hokudai.ac.jp)

# Mechanical, microvascular and cellular basis for the design of artificial blood

Amy G. Tsai, Hiromi Sakai\*, Eishun Tsuchida\* and Marcos Intaglietta

## Introduction

Several oxygen-carrying plasma expanders (OCPEs, “artificial blood” or “blood substitute”) are under development, however, a safe, efficacious and economic product is not yet available. This is in part due by the fact that the effects of these blood substitutes on the microcirculation have not been appreciated, and the fluids developed have not been designed to conform with biological requirements of the tissue in the conditions in which OCPEs will be used. Furthermore the fluids developed do not conform with the mechanical conditions in the microcirculation. It is well established that most of the products developed so far cause vasoconstriction<sup>1)</sup>, reducing capillary perfusion and tissue oxygenation<sup>2-4)</sup>, a negative outcome for tissue survival.

This result stems from the perception that the primary focus in developing hemoglobin OCPEs is to create solutions that have identical oxygen carrying properties of blood (e.g., concentration, oxygen affinity, Hb-oxygen dissociation curve). Unfortunately when academic physiologists and clinicians tested this products, it was in general found that they did not yield satisfactory results. This was, and continues to be, due to the imperfect understanding of how the physical properties of blood affect microvascular function.

To this date development of OCPEs is focused on the concept that this fluid should have the oxygen carrying capacity of the missing red blood cells, and that it is beneficial for the resulting circulating mixture to have a viscosity lower than natural blood. The idea that lowering blood viscosity has a therapeutic value is firmly embedded in medical thinking. These principles have guided and form the basis of products now undergoing clinical trials. Unfortunately the leading candidate for market entry, the Baxter Healthcare product HemeAssist® ( $\alpha\alpha$ -hemoglobin) met with a predicted failure, while similar products are presently in stage III clinical trials, although it is generally found that they aggravate the tissue oxygenation deficiency to be remedied.

A new impetus for the development of artificial blood has been generated in Japan and the United States, once direct *in vivo* experimentation made apparent that fluid resuscitation must prioritize restoration of microvascular function. This paper highlights the prin-

cipal ideas and findings that form the basis of this renaissance in artificial blood.

## Microvascular effects of plasma expanders

In order to understand the biological and physical phenomena that underlay the substitution of blood with a non-cellular oxygen carrying solution it is useful to separate the problem into two parts, namely restoration of volume and restoration of oxygen carrying capacity. This separation is justified since with the exception of liposomes and fluorocarbons, the technology is focused on molecular hemoglobin (Hb) solutions as OCPEs, whose physical difference with volume restoration fluids is oxygen carrying capacity.

Replacement of blood with a colloidal or crystalloid solution, or hemodilution, is a safe and routine procedure up to a 50% loss of the red blood cell (RBC) mass, as repeatedly validated on a systemic basis<sup>5)</sup>. A 50% decrement in the concentration of RBCs brings the concentration of Hb to the transfusion trigger which is generally accepted to be in the neighborhood of 7 g Hb/dl. Up to this hemoglobin concentration tissue pO<sub>2</sub>, blood pressure and functional capillary density (FCD) remain normal in healthy organisms. Microvascular conditions change when this threshold is passed<sup>6)</sup>.

Dilution of blood to the transfusion trigger causes blood viscosity, which is a function of hematocrit, to decrease to about 2 cP (from about 4 cP). This change reduces hydraulic pressure losses in the systemic circulation, elevates right atrial pressure, increases filling of the heart, enhances heart contractility, increasing cardiac output and blood flow velocity<sup>7-8)</sup>. Increased cardiac output compensates decreased oxygen carrying capacity due to reduced RBCs and oxygen delivery to the capillaries remains constant<sup>9-11)</sup>. Arteriolar/venular diffusional shunting is diminished because of the increased velocity and the decreased RBC residence time in these vessels<sup>12)</sup> and increased capillary flow velocity causes oxygenated RBCs to travel further before yielding their oxygen<sup>13)</sup>. As a result oxygen delivery and tissue oxygen remain nearly constant up to a hematocrit reduction of 50%. Thus OCPEs are not needed for RBC losses up to 50% and tissue oxygenation is unchanged from baseline in hemodilution where systemic hematocrit is reduced by 60%<sup>14)</sup>.

Department of Bioengineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093-0412, USA

\*Department of Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo 169-8555, Japan

Address correspondence to: Prof. M. Intaglietta, Department of Bioengineering, University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0412 USA, Telephone: (1) (858) 534 4275 Fax: (1) (858) 459 8698 e-mail mintagli@ucsd.edu

Flow compensations for reduced RBCs does not continue when hematocrit decreases beyond 50% of the normal value because cardiac output cannot increase indefinitely<sup>15)</sup>. Furthermore the production of EDRF by shear stress is limited, and when this stimulus is not maintained the microcirculation constricts and FCD decreases.

#### **Microvascular physiology of oxygen delivery relevant to plasma expanders**

The physical properties of the circulating blood that results from the mixture of the OCPE and blood affect gas delivery and microvascular function. Gas exchange within the tissue has focused on how gases are exchanged between blood flowing in a single capillary, and a surrounding tissue cylinder and tissue oxygenation is extrapolated from this model<sup>16)</sup>. A universal assumption is that oxygen is exchanged at this level, implying the existence of large blood/tissue pO<sub>2</sub> gradients in a substantial portion of tissue capillaries. Most capillaries, however, appear to have an oxygen concentration which is in near equilibrium with the tissue, thus the large oxygen gradients are not present, suggesting that capillaries may not be the primary mechanism for tissue oxygenation<sup>17)</sup>.

Our findings in the hamster window chamber model show that most of the oxygen is delivered by the arterioles<sup>17)</sup>. In this tissue, comprised of subcutaneous tissue and skeletal muscle, the average capillary pO<sub>2</sub> is about 25 mmHg and venular pO<sub>2</sub> is higher. This indicates that about half of the oxygen in blood exits the vessels before it arrives at the tissue and that little oxygen is contributed to the tissue by the capillaries<sup>6)</sup>. Although capillaries do not appear to be the principal suppliers of oxygen in some tissues, our studies<sup>18-19)</sup> have shown that maintenance of FCD in shock is a critical parameter in determining the outcome in terms survival vs. non-survival, independently of tissue pO<sub>2</sub>, suggesting that extraction of products of metabolism may be a more critical function of capillaries than oxygenation.

#### **Current status of information on oxygen delivery to tissue**

The design of an OCPE requires to understand how its properties affect oxygen distribution in the microcirculation and tissue. Until recently this was not possible because there were no methods to measure intra- and extravascular oxygen levels. We have developed a phosphorescence decay technique for measuring oxygen partial pressure optically in the microvessels and the surrounding tissue<sup>20-24)</sup> that allows for *in vivo* analysis of the assumptions in the Krogh tissue oxygenation model<sup>16)</sup>. Results for skeletal muscle at rest and subcutaneous connective tissue of the hamster skin<sup>6)</sup> show that:

- 1) Capillary blood pO<sub>2</sub> is only slightly higher (about 5 mmHg) than tissue pO<sub>2</sub>.
- 2) Arterio/venous capillary pO<sub>2</sub> differences are very small, because tissue pO<sub>2</sub> is essentially uniform, and capillaries are nearly in oxygen equilibrium with the tissue.
- 3) A major portion of blood oxygen is delivered to the tissue by the arterioles.

The finding that the capillaries are not the only source of O<sub>2</sub> in the microcirculation have been reported by Duling and Berne, 1970<sup>25)</sup>, who measured significant O<sub>2</sub> delivery from the arterioles. The polarographic microelectrode used, however did not allow for consistent measurements of microvascular blood pO<sub>2</sub>. Itoh *et al.*, 1994<sup>26)</sup>, and Yaegashi *et al.*, 1996<sup>27)</sup> have developed methods for mapping pO<sub>2</sub> that should provide quantitative insight into tissue oxygen levels.

Oxygen distribution in the arteriolar network by spectrophotometric measurement of blood pO<sub>2</sub> in the microvessels by Pittman and Duling, 1975<sup>28)</sup>, revealed that arterioles deliver oxygen to the tissue at a rate that is an order of magnitude greater than could be accounted for by the oxygen gradients measured by microelectrodes in the surrounding tissue<sup>29)</sup>. This finding led to the hypothesis that the diffusion constant for oxygen in the microvessel wall is an order of magnitude greater than in water and tissue, however, there is no mechanism that can account for this phenomenon in the tissue compartment. Ellsworth *et al.*, 1988<sup>30)</sup>, mapped oxygen saturation in arteriolar and venular capillary networks of the cheek pouch retractor muscle and showed that arteriolar capillary saturation was about 61% vs. 40% for venular capillaries, thus the arteriolar network delivers about double of the oxygen delivered by the capillaries. These results are similar to ours. Their study found that 1/3 of the capillaries had negative longitudinal saturation gradients due to interaction with other blood vessels. Ellsworth *et al.*, 1990<sup>31)</sup>, reported the interaction of capillary oxygen with surrounding arterioles and venules and concluded that capillaries have a passive role in terms of oxygen delivery, since their oxygenation is a function of that of the tissue that surrounds them. Therefore OCPEs must be designed to deliver oxygen to arterioles as well as capillaries. Tsai *et al.* 1998<sup>32)</sup>, and Shibata and Kamiya, 1999<sup>33)</sup>, report that there are significant oxygen gradients at the arteriolar vessel wall, which may be related to a very high oxygen consumption in this compartment.

#### **Distribution of oxygen tension in the microcirculation**

The microcirculation is adapted to a specific distribution of oxygen tension that is in part determined by the shape of the oxygen dissociation curve for hemoglobin. In this system blood with specific oxygen tensions locates at specific microvascular sites as a result of the control of active mechanisms that sense oxygen partial pressure in both tissue and blood and partition oxygen delivery between the arteriolar and capillary circulation<sup>34)</sup>.

The partial pressure of oxygen in blood is distributed so that the knee of the oxygen dissociation curve for hemoglobin is located in the arterioles where the adrenergic sensor system in the arteriolar network has the highest density and presumably sensitivity<sup>35)</sup>. Arterioles prior to the fulcrum deliver most of the oxygen in tissues at rest. Capillary oxygen delivery may become the predominant mode of oxygen transport in working tissue. The shift from arteriolar to capillary oxygenation in exercising skeletal muscle would expose capillaries to very high blood pO<sub>2</sub>, a process related to the increase of flow and wall

shear stress, leading to a positive feedback process through the release of shear stress dependant vasodilators<sup>36-37)</sup>.

The relationship between partial pressure of oxygen and blood oxygen saturation, defined by the value of p50 (partial pressure of oxygen at which hemoglobin is 50% saturated) is important in determining how tissue is oxygenated. It is generally assumed that a high value of p50 leads to better tissue oxygenation because oxygen is more readily released. Considering our data on how oxygen is released in the microcirculation it becomes apparent that a high value of p50 causes a disproportionate increase in the oxygen released in the arterioles, which is a signal for vasoconstriction. Therefore, normal or lower p50 is preferable to avoid the constrictive stimulus. Low p50 constitutes a form of targeted oxygen delivery, since it causes oxygen to be delivered in tissue locations with low pO<sub>2</sub>.

Sakai *et al.*, 1999<sup>38)</sup>, carried out a study with hemoglobin vesicles with p50 of 9, 16 and 30 mmHg in the microcirculation of the hamster window model subjected to a 80% isovolemic blood exchange. Optimal p50 was at 16 mmHg, i.e., the p50 at which FCD and tissue pO<sub>2</sub> were maximal. Microvascular flow and diameter were also higher in arterioles and venules when the p50 of the hemoglobin vesicles was 16 mmHg. This result is supported by the study of Baines *et al.*, 1998<sup>39)</sup>, who compared oxygen delivery in isolated kidneys perfused with hemoglobin solutions with p50s at 11mmHg and 35 mmHg and found that the solution with the lower p50 delivered oxygen twice as effectively.

#### NO and tissue oxygenation

NO inhibits mitochondrial respiration<sup>40)</sup>. Whole body experiments show that NO synthesis inhibition by nitre-L-arginine (N.A., 30 mg/kg) increases oxygen consumption of resting conscious dogs by 37% indicating that basal NO release regulates tissue oxygenation<sup>41)</sup>. NO acts as a brake on tissue metabolism, reducing oxygen consumption, while the lack of NO increases metabolism and tissue oxygen consumption<sup>42)</sup>. Blood flow causes the production of NO from endothelial cells via shear stress mediated processes<sup>43)</sup>. Therefore flow, vascular tone, oxygen delivery, blood viscosity and NO production are directly coupled, and changes in the viscosity and oxygen carrying capacity of blood have a direct effect on tissue oxygenation. This is supported by the study of de Witt *et al.*, 1997<sup>44)</sup>, who showed that elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation *in vivo*. See also Dingwall and Kelly, 1998<sup>45)</sup>, and Crystal *et al.*, 1999<sup>46)</sup>.

#### Change from distributed to uniform viscosity due to molecular OCPEs

In the microcirculation larger arterioles are exposed to high blood pressure and high pO<sub>2</sub>, while smaller vessels are progressively exposed to lower pO<sub>2</sub> and pressure. The partition of hydraulic pressure and oxygen is a function of blood viscosity. Blood viscosity is also distributed in the microcirculation, because hematocrit varies continuous-

ly from the systemic value to less than 50% of the systemic value, as blood transits from the larger arterioles to the capillaries as a consequence of the Fahraeus-Lindqvist effect. This is a major effect because of the non-linear relationship between blood viscosity and hematocrit. In larger arterioles blood viscosity is 3.5 - 4.0 cP, while in the smaller arterioles viscosity is lower. This affects shear stress and shear stress dependant release of EDRF (NO and prostacyclin) since shear stress is present in a prescribed way in the microcirculation when the system is perfused by normal blood.

Molecular oxygen carrying and non carrying plasma expanders are not subjected to the Fahraeus-Lindqvist effect causing the whole microcirculation to be exposed to a uniform viscosity, significantly changing shear stress distribution. The same considerations apply to oxygen carrying capacity distribution in substituting RBCs with a molecular oxygen carrying material, since hematocrit decreases progressively as blood transits in the microcirculation, but oxygen carrying capacity becomes uniform with molecular oxygen carrying plasma expanders.

#### Effect of plasma viscosity

Although is generally believed that plasma viscosity should be low and that high plasma viscosity is representative of pathological conditions, there is evidence that high viscosity plasma is either beneficial, or has no adverse effect in conditions of extreme hemodilution. Waschke *et al.*, 1994<sup>47)</sup> found that cerebral perfusion is not changed when blood is replaced with fluids of the same intrinsic oxygen carrying capacity over a range of viscosities varying from 1.4 cP to 7.7 cP. Krieter *et al.*, 1995<sup>48)</sup> varied the viscosity of plasma by adding dextran 500 kDa and found that medians in tissue pO<sub>2</sub> in skeletal muscle were maximal at a plasma viscosity of 3 cP, while in the liver the maximum occurred at 2 cP. In general they found that up to a 3-fold increase in blood plasma viscosity had no effect on tissue oxygenation and organ perfusion when blood was hemodiluted. de Witt *et al.*, 1997<sup>44)</sup> found that elevated plasma viscosity causes sustained NO-mediated dilatation in the hamster muscle microcirculation. The recent paper by Tsai *et al.*, 1998<sup>44)</sup> further supports these concepts, showing that extreme hemodilution with high viscosity plasma expanders, leading to high viscosity plasma maintains FCD and improves tissue survival.

#### Hemoglobin based plasma expanders molecular size and vasoactivity

Oxygen carrying plasma expanders based on small molecular dimension hemoglobins exhibit vasoconstriction as repeatedly found with  $\alpha\alpha$ -hemoglobin. This is due to NO scavenging and the oversupply of oxygen to the arteriolar vessel wall caused by facilitated diffusion of oxygen transported by free molecular hemoglobin. Sakai *et al.*, 2000<sup>49)</sup> have completed a study comparing the microvascular effects of molecular hemoglobin solutions of different molecular radii and found a direct correlation between increasing molecular dimension and decreasing pressor effect, as well as decreased vasoconstric-

tion of small arteries and large arterioles. This study compared for the first time crosslinked Hb (XLHb), PEG-conjugated Hb, hydroxyethyl-starch-conjugated XLHb, polymerized XLHb, and PEG-modified Hb-vesicles (PEG-HbV). Their molecular diameters were 7, 22, 47, 68 and 224 nm, respectively. The bolus infusion of 7 ml/kg of XLHb (5 g/dl) caused immediate hypertension (34% increase in mean arterial blood pressure), the simultaneous decrease in diameter of A0 vessels and the decrease of blood flow throughout the microvascular network. Infusion of larger O<sub>2</sub> carriers resulted in lesser vasoconstriction and hypertension, PEG-HbV showing the smallest changes.

Similar results were found by Nakai *et al.*, 1996<sup>50</sup>, who studied the inhibition of endothelium dependent relaxation by acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins in rabbit aortic strips, concluding that the largest molecular configuration such as polyethylene glycol (PEG) conjugated hemoglobin and liposome encapsulated hemoglobin (HbV) had minimal effects.

Vasoconstriction has also been attributed to the possibility that smaller molecules may more easily penetrate endothelial cells, or pass through the endothelial barrier. The study of Nakai *et al.*, 1998<sup>51</sup>, investigated the passage of hemoglobin through endothelial cell culture monolayers. It supports this concept, which is also substantiated by the study of Faivre-Fiorina *et al.*, 1999<sup>52</sup>, *in vivo*. In this context extravasation of hemoglobin is proposed to become a sink that diverts NO as it diffuses to vascular smooth muscle, however, there is no direct proof for this process at present. It should be noted that the presence of molecular hemoglobin within the endothelial cell could mediate the expression of vasoconstrictive stimuli that have not been identified.

In general our results show that larger molecules provide for improved microvascular conditions, with liposome encapsulated hemoglobin yielding the optimal transport properties. It is notable that neither PEG-hemoglobins nor HbV's induced RBC aggregation, where the later can be formulated to exhibit the required physical properties particularly viscosity (3 - 4 cP), oncotic pressure dependent on the suspending medium (20 mmHg in 5% albumin, 40 mmHg in 8% albumin) and controllable oxygen affinity over a wide range p50 = 9 - 60 Torr)<sup>53,54</sup>.

#### Cellular effects of altered viscosity

The endothelium responds to changes in its mechanical and oxygen environment according to programmed genetic schemes that may be activated following changes in the mechanical environment of cells. As a consequence tissue perfusion with reduced viscosity blood may be deleterious at the cellular/endothelial level. One of these responses is the mechanism for self destruction, apoptosis, which is activated through a genetically controlled suicide process that eliminates cells no longer needed or excessively damaged. In this context hemodilution with low viscosity plasma expanders may cause cellular damage due to hypoxia and/or to the reduced vessel wall shear stress.

Hypoxia/ischemia may contribute to endothelial impairment due

to inflammatory reactions<sup>55</sup>. Activation of endothelium, platelets and neutrophils, leading to additional damage through the liberation of cytokines, can induce endothelial apoptosis<sup>56</sup>. The two mechanisms of cellular death (necrosis and apoptosis) have been studied in cell culture, but there is little information on events that take place *in vivo*. Irreversible damage to the microcirculation via necrosis may cause cessation of capillary flow through endothelial swelling, due to increased endothelial permeability following ischemic injury<sup>57</sup>. Endothelial swelling, a cause for the decrease of FCD, is in part reversible through the induction of hyperosmotic transients<sup>58</sup>. Microvascular damage due to apoptosis is not immediately functionally evident, since there is no mechanical change in the configuration of the endothelium that leads to a correlated change in capillary perfusion. However, this form of cell damage, once started, may not be reversible.

Maintained blood viscosity or increased plasma viscosity in reperfusion may be beneficial because basal levels of shear stress are necessary for the upregulation of superoxide dismutase and NO which act as a break to the apoptotic capacity of endothelial cells<sup>59</sup>. Shear stress mitigates apoptosis due to oxidative stresses caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>60</sup>. Increased shear stress leads to increased or normalized NO production. Shear stress dependant upregulation of Cu/Zn SOD and NO synthase blocks activation of the caspase cascade in response to TNF- $\alpha$  and oxygen radicals<sup>61</sup>. Thus the production of Cu/Zn SOD and NOS by shear stress is a cellular mechanism for the preservation of the integrity of the endothelium. Furthermore shear stress leads to the suppression of endothelin-1 gene expression<sup>62</sup>. Therefore normal shear stress may be necessary for lowering peripheral vascular resistance via gene expression mediated mechanisms.

Cell culture experiments show that interference with NO production is an apoptotic stimulus<sup>63</sup> which as been shown to be directly mediated by shear stress upregulation of superoxide dismutase and NO synthase<sup>61</sup>. These findings directly link reperfusion with low viscosity blood and the potential for apoptotic tissue and/or endothelial impairment. Reperfusion with Ringer's lactate causes an immediate 5-fold increase in apoptotic index of the mucosa and smooth muscle of the bowel wall and the liver relative to reperfusion with shed blood or hypertonic saline<sup>64</sup>. Similarly, Sun *et al.*, 1999<sup>65</sup>, report that the expression of Bax protein, a potent inducer of apoptosis is significantly increased in the lung after 75 min hemorrhagic shock when resuscitated with Ringer's lactate when compared with albumin, blood, starch and dextran.

Normalization of NO production lowers oxygen requirement of the endothelium and parenchymal tissue<sup>66</sup>. Thus normalized blood viscosity or increased plasma viscosity is not only beneficial via the transferral of pressure to the microcirculation and improvement of microvascular flow and FCD, but also because of the mitigation or prevention of long term (hours to days) endothelial damage triggered by programmed gene expression, and lowered potential damage due to hypoxia by lowering the tissue oxygen demand.

The use of plasma expanders for volume replacement beyond the transfusion trigger reduces the need for blood transfusions, however increase the risk of microvascular impairment due to lowered blood oxygen delivery or lowered shear stress. Blood and plasma viscosity are critical since lowered values increase oxygen delivery but decrease shear stress. Consequently a blood substitute, beyond its effect in maintaining FCD, should be effective in preventing ischemia and apoptosis, presumably through the maintenance of adequate levels of shear stress.

#### Shear stress changes in the circulation

The substitution of red blood cells in the circulation by plasma expanders in the circulation lowers blood viscosity,  $\mu$ , and increases blood flow  $Q$ . The equation for shear stress at the wall shows that these are compensating effects since shear stress  $\sigma$  is proportional to both parameters, according to  $\sigma = 4\mu Q/\pi r^3$ , where  $r$  is the radius of the conduit. Valeri *et al.*, 1998<sup>67)</sup>, on the basis of a mathematical analysis reported that shear stress is a minimum at the optimal hematocrit of 35%, and that it increases as hematocrit is decreased. By contrast, the experimental data reported by Messmer *et al.*, 1972<sup>68)</sup>, shows a linear relationship between cardiac output and hematocrit, a result opposite to that of Valeri *et al.*, 1998<sup>67)</sup>.

These contradictions arises in comparing theoretical and experimental studies. Shear stress must be evaluated in the microcirculation, where it has the largest effect due surface area, high rates of shear, and vessels regulate diameter in response to the release of shear stress dependant vasoactive agents. Determination of shear stress in the microcirculation is complicated because blood viscosity is lower than systemic, and its value must be inferred from local hematocrit estimates and plasma viscosity measurements. These problems are less relevant in extreme hemodilution when blood viscosity is nearly Newtonian, allowing for a better prediction of the shear rate  $\epsilon$  at the wall, where shear stress can be estimated according to  $\sigma = \mu\epsilon$ . Tsai *et al.*, 1998<sup>14)</sup>, reported that in arterioles of 50  $\mu\text{m}$  diameter, wall shear rate was 600  $\text{sec}^{-1}$  at normal hematocrit, and at 12% hematocrit this was reduced to 400  $\text{sec}^{-1}$ . Assuming that blood viscosity was reduced from the systemic value of 4.5 cP to 2.1 cP, then shear stress was reduced from 26.4 dynes/cm<sup>2</sup> to 8.6 dynes/cm<sup>2</sup>, or four fold. Introducing high viscosity dextran 500 kDa vessel wall shear rate at 12% hematocrit was 490  $\text{sec}^{-1}$ , blood viscosity was 2.8 cP and wall shear stress increased to 13.7 dynes/cm<sup>2</sup>.

#### Facilitated diffusion

Winslow, 1999<sup>69)</sup>, observed that when a relatively small amount of Hb is dissolved in plasma relative to that present in RBCs, the amount of oxygen present in plasma is significantly increased over that solely due to its solubility in plasma, due to the chemical binding of Hb and oxygen. This situation has a profound effect on the amount of oxygen that is transported from the RBCs to the vessel wall, across the plasma layer, since in the presence of dissolved Hb, oxygen is transported by

both its concentration gradient in the plasma layer, and the concentration gradient of HbO<sub>2</sub>, according to the process of facilitated diffusion<sup>70)</sup>. The additional oxygen flux due to facilitated diffusion is significant even though the diffusion constant for the Hb molecule is much smaller than that of oxygen in plasma.

These effects were demonstrated by Page *et al.*, 1998<sup>71)</sup>, who performed experiments in 20 to 100  $\mu\text{m}$  diameter silicon tubes and measured oxygen uptake and delivery from blood and mixtures of blood and hemoglobin solutions. This study showed that as a consequence of facilitated diffusion the mixtures were more effective in transporting oxygen across the tubes, an effect that was also influenced by shear augmentation of diffusion caused by the presence of RBCs<sup>72)</sup>.

Hemoglobin in solution that carry oxygen affect the rate of oxygen transport from blood to the microvascular wall, a process that follows two different routes. One is the conventional diffusion of oxygen. The second is the diffusion of the hemoglobin molecule itself, which when carrying oxygen constitutes a second and additional process for oxygen delivery to the tissue. These two mechanisms acting in concert deliver too much oxygen to the vascular wall, causing the blood vessels to shut down, which constitutes a third mechanism that contributes to the deleterious vasoconstriction. Hemoglobin molecules chemically configured to have large dimensions significantly lower the additional flux of oxygen because of their intrinsic lower diffusion.

#### Fluid shifts

The introduction of comparatively large amounts colloids in solution in the circulation increases blood colloid osmotic pressure (COP), since this is determined by the concentration of active molecules. In dealing with large molecules, their own molecular volume also excludes solution volume. Thus large volume molecules affect COP by their intrinsic number per unit volume, and by the fact that their presences lowers the available volume in which they can be dissolved. In general, the net effect is that molecular solutions of materials with equivalent molecular weight > 300,000 Daltons in concentrations of about 3 - 5 % have large COPs, in the range of 50 mmHg and higher, which should be compared with the normal for plasma which is about 22 mmHg. Therefore the introduction in the circulation of these materials significantly affects fluid balance causing autotransfusion, and increased intravascular fluid volume. Large fluid shifts affect blood and tissue fluid pressure. Extraction of fluid from the tissue due to high COP dehydrates the tissue, which may be a problem in some conditions of fluid resuscitation. Fluid shifts due to these processes are directly reflected by the changes of tissue pressure, which should become increasingly negative<sup>73)</sup>.

An interesting possibility is that the increased vascular volume increases blood pressure, which in the absence of vasoconstrictor effects would distend the systemic and microvasculature. In this scenario capillary pressure is increased, which favors filtration of fluid into the tissue, thus counteracting the absorptive effect of high COP.

This effect is speculative, since the transmission of blood pressure into the microcirculation could also elicit vasoconstriction through the myogenic mechanism. This illustrates the necessity of monitoring these effects at the level of the *in vivo* microcirculation, and the need to combine direct monitoring of microvascular dimensions, as well as capillary and tissue fluid COP and plasma volume.

### Design concepts for artificial blood

The loss of blood, red blood cells, and oxygen carrying capacity equates to the impairment of oxygenation and the potential demise of the organism due to anoxia. This fatal outcome becomes increasingly more probable as we approach the so called transfusion trigger, or the point at which the loss of RBCs leads to a decrease in oxygen carrying capacity that is no longer automatically compensated. Upon reaching this point it is the universal practice to restore oxygen carrying capacity by the transfusion of blood.

The organism tolerates some loss of RBCs provided that this is not paralleled by the loss of blood volume. The relative proportion of tolerated losses is a 50% RBC deficit but only 10% of blood volume losses. Thus volume losses must be rapidly corrected which can be accomplished with a variety of plasma expanders whose capacity to carry oxygen is not immediately relevant to the rescue process.

The transfusion trigger is a landmark that separates the form of fluid resuscitation to be deployed, i.e., fluid vs. blood, and volume vs. oxygen carrying capacity. It identifies the point at which fluid resuscitation shifts from a systemic deficiency centered on circulatory volume, to the default of microscopic phenomena related to cellular, microcirculatory and physical processes. Since artificial blood will be used near this transition, it is necessary to understand the biological and physical processes that occur in the microcirculation when we introduce fluids into the circulation upon passing the transfusion trigger.

The present understanding of the microcirculation crystallized at the beginning of the 20th century when mathematical analysis established that capillaries in the tissue had a mirror image function of capillaries in the lung. In the lung they collected oxygen, and in the tissue they delivered oxygen. This symmetrical scheme was appealing, and intuitively logical, but unsupported by experimental data. Our work at Waseda University and UCSD has led to revision of many of these ideas. An important new conceptualization is that oxygen delivery may not be the most important capillary function for tissues at rest. Our findings, relevant for shock and trauma where blood transfusions and artificial blood will be used, show that the most critical capillary function is to provide an exit route for the metabolic byproducts<sup>19</sup>. Thus, if capillaries next to active cells do not perform this function, waste products accumulate and being toxic eventually cause the demise of the cells surrounding the obstructed capillary.

### Functional capillary density as a the key parameter

Our premise of the priorities in capillary function is that extraction of waste products is first, and oxygenation is secondary. Therefore in designing a blood substitute or OCPE, it is necessary to know how the properties of blood are related to the maintenance of open capillaries. All blood substitutes designed to date focus on their capacity of delivering oxygen, and essentially ignore whether they insure a mechanically open microcirculation. This problem is aggravated because most "artificial blood" are based on hemoglobin which when introduced into the circulation is a vasoconstrictor, which reduces the number of open capillaries. Therefore the problem was not only ignored, but was resolved in fashion that guaranteed a result opposite to the needed outcome.

In order to insure that capillaries remain open we must understand their mechanical properties. Capillaries like blood vessels have been assumed to be tubes, however this is not borne out by the analysis of their mechanical and transport properties, which shows that they physically reflect the properties of the material in which they are embedded, i.e., the surrounding tissue<sup>74</sup>. In other words, in mechanical terms capillaries behave like tunnels, a perspective that leads to a very different interpretation and understanding of their behavior. Thus mechanically they cannot be considered to be rigid, but endowed with the elasticity of the surrounding cells. Experimentally their diameter was found to be insensitive to the increase of intra-capillary blood pressure, which corresponds to the inability to increase the dimensions of a mountain by pressurizing the content of a tunnel. Conversely, being tubes which lack inner scaffolding to support the mountain, they collapse if the inside pressure falls below a given threshold. Therefore the fluid properties of blood must be such that an adequate amount of arterial blood pressure is transmitted to the capillaries to insure that they remain open.

Transmission of hydraulic pressure to the capillaries is hindered by vasoconstriction, and is determined by the distribution of pressure losses in the arterial circulation. In a rigid circulation, high viscosity also hinders the transmission of arterial pressure to the capillaries, thus lowering systemic viscosity as in hemodilution improves capillary flow, as less pressure is lost in the circulation preceding the capillaries. However this process is effective only up to the transfusion trigger as shown by the practice of hemodilution. Introducing molecular solutions in the circulation beyond the transfusion trigger further lowers blood viscosity, which induces vasoconstriction which lowers FCD. This phenomenon can be reversed by increasing plasma viscosity so that blood viscosity in the central circulation is lowered, but blood viscosity in the peripheral circulation is increased. This is the consequence of blood viscosity in the central circulation is dependant on hematocrit squared, and only linearly dependant on hematocrit in the microcirculation<sup>70</sup>. A similar situation ensues in terms of oxygen delivery. Since capillaries have no impermeable walls, such as the garden hose relative to water, oxygen exit is solely hindered by the resistance to diffusion in the medium that surrounds them. Thus oxygen delivery by capillaries (and blood vessels) is akin to the delivery

of water by a leaky truck: if the truck is slow the water will leak out prior to arrival to destination. In the case of blood adequate oxygen delivery requires high velocity of blood flow. Obviously vasoconstriction hampers this process.

### Shear stress and vasoactivity

A resuscitation fluid of high viscosity introduced in the presence of a severe loss of red blood cells has the effect of maintaining the shear stress generated by blood flowing over the endothelium. This shear stress is necessary to cause the vessel walls to release vasodilators and may counteract the constrictive effects of hemoglobins. Furthermore the fluid further dilutes the RBCs in central blood, where viscosity is dependant on hematocrit squared, thus lowering blood viscosity in these vessels where blood pressure is high, while it increases overall viscosity in the peripheral vessels where the concentration of red blood cells changes little, and blood pressure is low. The net effect is that more central pressure is transmitted to the periphery, the capillaries are distended and opened, and blood flow velocity is increased.

It may be that molecular hemoglobin solutions in blood are intrinsically vasoconstrictive because of the scavenging effect on NO, an effect that is aggravated if low viscosity conditions depress the production of this vasodilator by shear stress. Rohlf *et al.*, 1988<sup>76</sup>, found that hemoglobins with different pressor effects and solution properties had similar reaction kinetics with NO, showing that NO scavenging per se is not the principal factor in causing vasoconstriction, and adequate levels of shear stress may be sufficient to counteract in part the vasoconstrictive molecular effect. It is also probable that some level of vasoconstriction is beneficial, or at least compensates for decreased blood viscosity due to lower hematocrits if capillaries remain open.

### Summary and conclusions

In conclusion, the formulation of artificial blood based on modified hemoglobin plasma expanders is based on several countercurrent ideas, comprising the concept that oxygen delivery is of secondary importance to open capillaries, that lowering blood viscosity is not of universal benefit, that high affinity hemoglobin is more efficacious in conditions of decreased oxygen delivery capacity, that high oncotic pressures may be counteracted by high capillary pressure in preventing fluid shifts, and that low viscosity perfusion may provoke irreversible cell damage. Central to these ideas is the concept that the transfusion trigger may also be a "viscosity trigger" indicating the threshold beyond which blood viscosity should not be further decreased.

A corollary is that an oxygen carrier that prioritizes open capillaries over oxygen delivery results in an effective and economic hemoglobin-based blood substitute. Attainment of optimal microvascular function in volume restitution allows to reduce the oxygen carrying capacity of the OCPE, thus lowering the need for modified Hb and costs making the product not only efficacious but also economically competitive with blood.

### Acknowledgments

We thank Dr. Shinji Takeoka for his insightful discussion on the synthesis of modified Hb molecules. Supported in part by a generous gift from Dr. John W. Prather, USPHS Grant IR24 HL 64395-01 and 1 R01 HL62354-01, Health Sciences Research Grant from the Japanese Ministry of Health and Welfare, and a Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, Japan (12480268).

### References

1. Macdonald VW, Winslow RM, Marini MA, Klinker MT. Coronary vasoconstrictor activity of purified and modified human hemoglobin. *Biomat Art Cells and Art Org* 1990; 18:263-82.
2. Tsai AG, Kerger H, Intaglietta M. Microcirculatory consequences of blood substitution with  $\alpha\alpha$ -hemoglobin. In: Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M, editors. *Blood substitutes. Physiological basis of efficacy*. Boston, MA: Birkhauser; 1995. p. 155-174.
3. Tsai AG, Kerger H, Intaglietta M. Microvascular oxygen distribution: Effects due to free hemoglobin in plasma. In: Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M, editors. *Blood substitutes*. Boston, MA: Birkhauser; 1996. p. 124-131.
4. Tsai AG, Friesenecker B, Kerger H, Sakai H, Intaglietta M. The mechanism of tissue oxygenation and the design of oxygen carrying plasma expanders. In: Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M, editors. *Advances in Blood Substitutes. Industrial Opportunities and Medical Challenges*. Boston, MA: Birkhauser; 1997. p. 189-206.
5. Tuma R. "Continuing Education", Temple University School of Medicine, "The Role of Hemodilution in Optimal Patient Care", 1989.
6. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 1996; 32:632-43.
7. Richardson TQ, Guyton AC. Effects of polycythemia and anemia on cardiac output and other circulatory factors. *Am J Physiol* 1959; 197:1167-70.
8. Messmer K. Hemodilution. *Surg Clinis N Am* 1975; 55:659-78.
9. Fan FC, Schuessler GB, Chen RYZ, Chien C. Effect of hematocrit alteration on the regional hemodynamics and oxygen transport. *Am J Physiol* 1980; 238(7):H545-52.
10. Mirhashemi S, Messmer K, Arfors KE, Intaglietta M. Microcirculatory effects of normovolemic hemodilution in skeletal muscle. *Int J Microcirc Clin Exp* 1987; 6:359-70.
11. Mirhashemi S, Breit GA, Chavez RH, Intaglietta M. Effects of hemodilution on skin microcirculation. *Am J Physiol* 1988; 254(23):H411-6.
12. Mirhashemi S, Ertefai S, Messmer K, Intaglietta, M. Model analysis of the enhancement of tissue oxygenation by hemodilution due to increased microvascular flow velocity. *Microvasc Res* 1987; 34:290-301.
13. Tsai AG, Intaglietta, M. Local tissue oxygenation during constant red blood cell flux: a discrete source analysis of velocity and

- hematocrit changes. *Microvas Res* 1989; 37(3):308-22.
14. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H, Intaglietta, M. Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skin fold model. *Am J Physiol* 1988; 275(37):H2170-80.
  15. Hutter J, Habler O, Kleen M, Tiede M, Podtschaske A, Kemming G, Croso C, Batra S, Keipert P, Faithfull S, Messmer K. Effect of acute normovolemic hemodilution on distribution of blood flow and tissue oxygenation in dog skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1999; 86(3):860-6.
  16. Krogh A. The number and distribution of capillaries in muscle with the calculation of the oxygen pressure necessary for supplying the tissue. *J Physiol* 1918; 52:409-515.
  17. Kerger H, Torres Filho IP, Rivas M, Winslow RM, Intaglietta M. Systemic and subcutaneous microvascular oxygen tension in conscious Syrian golden hamsters. *Am J Physiol* 1995; 267(36):H802-10.
  18. Kerger H, Saltzman DJ, Menger MD, Messmer K, Intaglietta M. Systemic and subcutaneous microvascular pO<sub>2</sub> dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am J Physiol* 1996; 270(39):H827-36.
  19. Kerger H, Waschke KF, Ackern KV, Tsai AG, Intaglietta M. Systemic and microcirculatory effects of autologous whole blood resuscitation in severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1999; 276(45):H2035-43.
  20. Vanderkooi JM, Maniara G, Green TJ, Wilson DF. An optical method for measurement of dioxygen concentration based on quenching of phosphorescence. *J Biol Chem* 1987; 262:5476-82.
  21. Shonat RD, Wilson DF, Riva CE, Pawlowski, M. Oxygen distribution in the retinal and choroidal vessels of the cat as measured by a new phosphorescence imaging method. *Applied Optics* 1992; 31:3711-8.
  22. Wilson DF. Measuring oxygen using oxygen dependent quenching of phosphorescence: a status report. *Adv Exp Med Biol* 1993; 333: 225-32.
  23. Torres Filho IP, Intaglietta M. Micro vessel pO<sub>2</sub> measurements by phosphorescence decay method. *Am J Physiol* 1993; 265(34):H1434-8.
  24. Torres Filho IP, Leunig M, Yuan F, Intaglietta M, Jain RK. Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91(6):2081-5.
  25. Duling BR, Berne RM. Longitudinal gradients in perarteriolar oxygen tension. A possible mechanism for the participation of oxygen in the local regulation of blood flow. *Circ Res* 1970; 27:669-78.
  26. Itoh T, Yaegashi K, Kosaka T, Kinoshita T, Morimoto T. In vivo visualization of oxygen transport in microvascular network. *Am J Physiol*. 1994; 267(36):H2068-78.
  27. Yaegashi K, Toshiyuki I, Kosaka T, Fukushima H, Morimoto T. Diffusivity of oxygen in microvascular beds as determined from pO<sub>2</sub> distribution maps. *Am J Physiol* 1996; 270(39):H1390-7.
  28. Pittman RN, Duling BR. Measurement of percent hemoglobin in the microvasculature. *J Appl Physiol* 1975; 38:321-7.
  29. Popel AS, Pittman RN, Ellsworth ML. Rate of oxygen loss from arterioles is an order of magnitude than expected. *Am J Physiol* 1988; 256(25):H921-4.
  30. Ellsworth ML, Popel AS, Pittman, RN. Assessment and impact of heterogeneity of convective oxygen transport parameters in capillaries of striated muscle: Experimental and theoretical. *Microvasc Res* 1988; 35:341-62.
  31. Ellsworth ML, Pittman RN. Arterioles supply oxygen to capillaries by diffusion as well as by convection. *Am J Physiol* 1990; 258(27): H1240-3.
  32. Tsai AG, Friesenecker B, Mazzoni MC, Kerger H, Buerk DG, Johnson PC, Intaglietta, M.. Microvascular and tissue oxygen gradients in the rat mesentery. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998; 95:6590-5.
  33. Shibata M, Kamiya A. In vivo measurement of microvascular and tissue pO<sub>2</sub> in the rat skeletal muscle. *Microcirculation Annual* 1999; 15:71-2.
  34. Johnson PC. Brief Review: Autoregulation of blood flow. *Circ Res* 1986; 59:483-95.
  35. Saltzman D, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. The microvasculature in skeletal muscle. VI. Adrenergic innervation of arterioles in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res* 1992; 44:263-73.
  36. Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL. Flow effects on prostacyclin production in cultured human endothelial cells. *Science* 1985; 227:1477-9.
  37. Smiesko V, Lang DJ, Johnson PC. Dilator response of rat mesenteric arcading arterioles to increased blood flow. *Am J Physiol* 1965; 257(26):H1958-65.
  38. Sakai H, Tsai AG, Rohlf RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitutes: influence of O<sub>2</sub> affinity. *Am J Physiol* 1999; 276(45):H553-62.
  39. Baines AD; Adamson G, Wojciechowski P, Pliura D, Ho P, Kluger R. Effect of modifying O<sub>2</sub> diffusivity and delivery on glomerular and tubular function in hypoxic perfused kidney. *Am J Physiol* 1998; 274(2):F744-52.
  40. Geng YJ, Hansson GK, Holme E. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1992; 71:1268-76.
  41. Shen W, Hintze TH, Wolin MS. Nitric Oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation* 1995; 92:3505-12.
  42. Weiqun S, Xu X, Ochoa M, Wolin MS, Hintze TH. Role of nitric

- oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs. *Circ Res* 1994; 75:1086-95.
43. Kuchan MJ, Jo H, Frangos JA. Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am J Physiol* 1994; 267(35):C753-8.
  44. de Witt C, Schafer C, von Bismark P, Bolz SS, Pohl U. Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation *in vivo*. *Pflugers Arch* 1997; 434:354-61.
  45. Ingwall JS, Kelly RA. Nitric oxide, myocardial oxygen consumption and ATP synthesis. *Circ Res* 1998; 83:1067-8.
  46. Crystal GJ, Zhou X, Halim AA, Alam S, El-Orbany M, Salem MR. Nitric oxide does not modulate whole body oxygen consumption in anesthetized dogs. *J Appl Physiol* 1999; 86:1944-9.
  47. Waschke KF, Krieter H, Hagen G, Albrecht DM, Van Ackern K, Kuschinsky W. Lack of dependence of cerebral flow on blood viscosity after blood exchange with a Newtonian O<sub>2</sub> carrier. *J Cereb Blood Flow & Metab* 1994; 14:871-6.
  48. Krieter H, Bruckner UB, Kafaliakis F, Messmer K. Does colloid induced plasma hyperviscosity in haemodilution jeopardize perfusion and oxygenation of vital organs? *Acta Anaest Scad* 1995; 39:326-44.
  49. Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Takeoka S, Tsuchida E. Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem* 2000; 11:56-64.
  50. 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 Physiol* 1996; 28:115-23.
  51. Nakai K, Sakuma I, Ohta T, Ando J, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA. Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *J Lab Clin Med* 1998; 132:313-9.
  52. Faivre-Fiorina B, Caron A, Fassot C, Fries I, Menu P, Labrude P, Vigneron C. Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell free hemoglobin administration in guinea pig. *Am J Physiol* 1999; 276(45):H776-H80.
  53. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* 1998; 40:66-78.
  54. Sakai H, Hara H, Yuasa M., Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol* 2000 (in press).
  55. Suematsu M, DeLano FA, Poole D, Engler RL, Miyasaka M, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. Spatial and temporal correlation between leukocyte behavior and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation. *Lab Invest* 1994; 70:684-95.
  56. Robaye B, Mosselams R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal cells *in vitro*. *Am J Pathol* 1991; 38:447-53.
  57. Lopez-Farre A, Rodriguez-Feo JA, Sanchez de Miguel L, Rico L, Casado S. Role of nitric oxide in the control of apoptosis in the microvasculature. *Int J Biochem & Cell Biol* 1998; 30:1095-106.
  58. Mazzoni MC, Borgstrom P, Arfors KE, Intaglietta M. The efficacy of iso- and hyperosmotic fluids as volume expanders in fixed volume and uncontrolled hemorrhage. *Ann Emerg Med* 1990; 19:350-8.
  59. Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher, AM. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of akt in human endothelial cells: Involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* 1998; 83:334-41.
  60. Hermann C, Zeiher AM, Dimmeler S.. Shear stress inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3588-92.
  61. Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zeiher AM. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:656-64.
  62. Malek AM, Jiang L, Lee I, Sessa WC, Izumo S, Alper SL. Induction of nitric oxide synthase mRNA by shear stress requires intracellular calcium and G-protein signals and is modulated by PI 3 kinase. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 254(1):231-42.
  63. Shen YH, Wang XL, Wilcken DEL. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Letters* 1998; 433:125-31.
  64. Deb S, Martin B, Sun L, Ruff P, Burris D, Rich N, DeBreux S, Austin B, Rhee P. Resuscitation with lactated Ringer's solution in rats with hemorrhagic shock induces immediate apoptosis. *J Trauma* 1999; 46:582-9.
  65. Sun LL, Ruff P, Austin B, Deb S, Martin B, Burris D, Rhee P. Early up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression in rats with hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 1999; 11(6):416-22.
  66. Xie YW, Shen W, Zhao G, Xu X, Wolin MS, Hintze TH. Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration *in vitro*. *Circ Res* 1996; 79:381-7.
  67. Valeri CR, Crowley JP, Loscalzo J. The red cell transfusion trigger: has a sin of commission now become a sin of omission? *Transfusion* 1998; 38:602-10.
  68. Messmer K, Sunder-Plasman L, Klovekorn WP, Holper K. Circulatory significance of hemodilution: Rheological changes and limitations. *Adv Microcirc* 1972; 4:1-77.

69. Winslow RM. New transfusion strategies: Red cell substitutes. *Ann Rev Med* 1999; 50:337-53.
70. Nishide H, Chen XS, Tsuchida E. Facilitated oxygen transport with modified and encapsulated hemoglobins across non-flowing solution membranes. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1997; 25:335-46.
71. Page TC, Light WR, Hellums JD. Prediction of microcirculatory oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures. *Microvasc Res* 1998; 56:113-26.
72. Zydny AL, Colton CK. Augmented solute transport in the shear flow of a concentrated suspension. *PhysicoChem Hydrodynam* 1988; 10:77-96.
73. Hargens AR, Villavicencio JL. Mechanics of Tissue/Lymphatic Transport. In: Bronzino JD, editor. *Biomedical Engineering Handbook*. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1995. Chap 37, p. 493-504.
74. Fung YC, Zweifach BW, Intaglietta M. Elastic environment of the capillary bed. *Circ Res* 1966; 19:441-61.
75. Lipowsky HH, Usami S, Chien S. In vivo measurements of apparent viscosity and microvessel hematocrit in the mesentery of the cat. *Microvasc Res* 1980; 19:297-310.
76. Rohlf RJ, Bruner E, Chiu A, Gonzales A, Gonzales ML, Magde D, Magde MDJ, Vandegriff KD, Winslow RM. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J Biol Chem* 1998; 273:12128-12134.

# ヘム分解の生化学から見た人工酸素運搬体の設計戦略 Optimal Design of Hemoglobin-Based Blood Substitutes: with Reference to Heme Catabolism In Vivo

末松 誠<sup>1)</sup>, 京兼隆典<sup>2)</sup>, 二村雄次<sup>2)</sup>, 石村 翼<sup>1)</sup>

Makoto Suematsu<sup>1)</sup>, Takanori Kyokane<sup>2)</sup>, Yuji Nimura<sup>2)</sup>, Tsubasa Ishimura<sup>1)</sup>

## はじめに

人工血液の開発研究は、古くから行われてきた酸素運搬体／人工赤血球の開発研究に加えて、止血代替物としての人工血小板粒子にまでおよび、ヒトに貢献できるチャレンジングな生命科学研究のテーマとして活況を呈している。ヒト赤血球はヘモグロビンで満たされた無核の細胞であり、その主要な役割である酸素運搬能を人工的に代替物で置き換える試みは古くから行われてきた。赤血球は他の細胞に比べ構造がシンプルでありそれ自身の再生能がないことから、人工細胞の創製研究の面から見ても魅力的な対象である。現在、期限切れ赤血球から精製されたヘモグロビン分子を母体として、生体適合性を付与するために人工素材や特殊な化学反応による修飾を施し、酸素運搬能を「再生」させる試みとして血液代替物の開発が進行しつつある。最近この開発研究の過程で、赤血球が酸素運搬だけでなく、生体局所の酸素濃度を感知する「センサー」であること、あるいはヘモグロビンの機能が酸素に類似の生体内ガス分子であるNOやCOなどにより制御されること、またそれらの現象の生理学的意義が明らかにされるようになってきた。本稿ではヘモグロビンおよびヘムの体内代謝から見た人工赤血球の設計戦略について概説する。

## 1 低分子ガス状メディエータ（NO, CO）とヘモグロビンの相互作用

血管内皮由来の平滑筋弛緩因子がL-arginineから生成されるガス状メディエーターである一酸化窒素(NO)であることが発見されて以来<sup>1)</sup>、NOは全身諸臓器の抵抗血管を能動的に弛緩させ血流を保持させるために不可欠な因子であると考えられてきた。一方生体内で生成されるもう一つのガス状物質として一酸化炭素(CO)の生理作用が注目されてきた。著者らはラットの肝臓でCOがこの臓器の血管抵抗を低く保つための拡張物質として作用することを見い出した<sup>2, 3)</sup>。COはNO同様、血管平滑筋や内皮細胞の増殖に抑制的に作用することも示されている。これら二つのガス状物質と分子状酸素が持つ共通の性質として、ヘム蛋白、酵素との強い相互作用がある。血流中をながれる赤血球は

なんらかの”しかけ”で血管弛緩性ガス状物質の生理作用を損なうことなく酸素を末梢組織に輸送していると考えられる。しかしながら赤血球の持つ”しかけ”についてはまだ完全には解明されておらず、このことは理想的な人工酸素運搬体（人工赤血球）を開発する過程での一つのハードルとなっている。つまり体内に投与されたヘモグロビンは酸素輸送担体として働く一方で、状況によりNO, COのscavengerとして作用するため、これらのガス状物質の生理作用を理解することは安全な人工赤血球の開発を進める上で極めて重要である。

COは同じ低分子モノオキシドである NO 同様 soluble guanylate cyclase (sGC) を活性化して細胞機能を修飾することが報告されている。これは両者がsGCの補欠分子であるヘムに結合することによるコンフォーメーション変化による活性調節の結果である。一方同じヘム蛋白であるヘモグロビンとこの2つのガス状物質の相互作用には大きな違いが存在する<sup>4)</sup>。NOはラジカル分子のため、ヘモグロビンによる除去も CO に比べすみやかであり、CO のヘモグロビンへの結合力は NO の約千分の一とされている。しかしながら生体内での消去系となる赤血球のヘモグロビンとの相互反応は大きく異なっている。すなわち NO と結合した赤血球内の2価鉄のヘモグロビンは分解して硝酸イオンとメトヘモグロビンに変換し、メトヘモグロビンは還元されて元の2価鉄のヘモグロビンにリサイクルされるのに対し、CO は一度、2価鉄のヘモグロビンに結合すると安定な複合体 (ferrous-CO complex) を作り、肺のガス交換に際して酸素と可逆的に置き換わり、呼気中にそのままの形で排泄される点が特徴である。したがって、健常人の血中には通常1–2%程度のヘモグロビン–CO複合体が検出できる。一方、NO は非ヘム鉄や SH 基との反応性も高いことが知られているが、CO にはそのような性質は見られない。

さらに最近、NOとCOによるヘモグロビンの酸素親和性調節機構について極めて興味深い知見が報告された。ヘモグロビンは4つのヘムにそれぞれ酸素分子を結合させる能力を有するが、ひとつのヘムに酸素分子が結合すると他のヘムへの酸素分子の

1) 慶應義塾大学医学部医科学教室, 〒160-8582 新宿区信濃町35, Report of Biochemistry, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan, 2) 名古屋大学第一外科, The first Department of Surgery, Nagoya University

結合が強くなる性質を持つ。COのヘムへの結合は他の部位での酸素分子の結合を強くするため、酸素の解離が減弱することは広く知られている。一方NOは $\alpha$  subunitに結合すると $\beta$  subunitに結合している酸素分子の解離を促すような調節作用を持つことがYonetaniらにより明らかにされた<sup>5)</sup>。つまりNOとCOはヘムへの結合という点で共通の反応を示すが、その結果あらわれる作用は全く逆の方向であることになる。NOとヘモグロビンとの相互作用としてはStamlerらにより提唱されたNO donorとしてのS-nitrosyl 化合物の知見があるが、NOとヘム、およびNOとSHの反応速度定数を考慮すると後者の生理作用に疑問を投げかける報告もされている<sup>6)</sup>。 $\alpha$  subunitにNOを結合させたヘモグロビンは酸素を解離する能力が通常のものより高いことを利用し、これを酸素運搬体設計の戦略として用いる可能性も検討されるようになろう。

## 2. ヘモグロビンの代謝と分解：heme oxygenase-CO系の役割

ヘモグロビンのヘムの分解・解毒はheme oxygenaseにより行われる。本酵素はヘムのポルフィリン環への酸素添加反応により、 $\alpha$ -メテン炭素での開裂が起こり、同モルの一酸化炭素と鉄-ビリベルジン錯体が生成し、これが NADPH cytochrome P-450 reductaseにより還元され、鉄とビリベルジン、およびCOを生成する<sup>6)</sup>。ビリベルジンはビリベルジンリダクターゼによりビリルビンとなり、抱合されて胆汁中に排泄される。HOにはストレス応答で誘導される HO-1と、構成型の HO-2<sup>6)</sup>が知られている。正常状態でHO活性の高い臓器としては脳、脾、肝、精巣があげられ、脳や肝ではHO-2活性が優位であるのに対し、脾ではHO-1が優位である<sup>6)</sup>。体内でのヘモグロビン由来のヘムは分解されるヘム総量の約80%を占めており、そのほとんどは老廃赤血球に含まれているものと考えられている。しかしながら、過去の文献の成績と著者らの最近の知見をあわせると、おそらく正常個体では老廃赤血球自身は網内系（マクロファージ）で代謝されるものの、流血中で細胞外に放出されたヘモグロビンヘムは血液中のハプトグロビンやアルブミンに捕捉

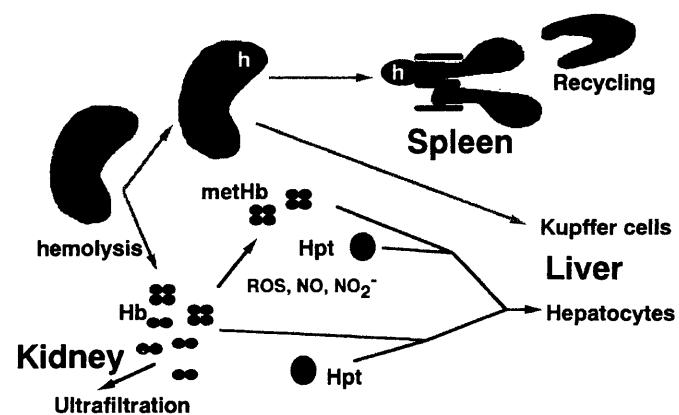


図1 体内における赤血球およびヘモグロビンの代謝と肝臓、脾臓、腎臓の役割。

され、肝臓の血管内皮のfenestrationを通過し臓器実質に到達して肝細胞で代謝されていると考えられる<sup>7, 8)</sup>（図1）。著者らは最近ラットのHO-1, HO-2の高発現細胞を樹立し、これらの細胞のミクロソーム分画をマウスに免疫し交叉反応を示さない抗ラットHO-1, HO-2モノクローナル抗体(GTS-1, GTS-2)を作成した<sup>7)</sup>。これらの抗体を用いた免疫組織化学により、ラットの正常な肝臓ではHO-1が組織マクロファージであるKupffer cellに、HO-2が肝実質細胞に発現していることが示された。すなわち正常の肝臓では2つのアイソザイムが異なる細胞に発現し、異なる由来のヘモグロビンを分解していることになる<sup>8)</sup>。ヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体のデザインを考える上で、このような生理学的なヘム分解のコンパートメントを考慮した設計が必要であることはいうまでもない。

## 3 病態時の肝微小循環機能維持のための人工酸素運搬体設計

肝臓はヘムの主要分解臓器としてCOを大量に生成し、自らの血流を維持するためにこれを利用する臓器である。したがってヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体を体内に投与する場合、この臓器の機能恒常性を維持できるような設計原理が求められることはいうまでもない。分離灌流肝（ラット）を用いたわれわれの検討では、正常灌流肝では肝静脈からのサンプル中約0.1~0.4 μM程度のCOが遊離してくることが、ミオグロビンを用いた分光分析で明らかとなった<sup>2, 3)</sup>。これは流量にして約0.6 nmol/min/g liverに相当する。正常肝におけるCO生成系は全体の約2/3が肝実質細胞に局在するといわれており、正常肝では肝細胞からのCOの生成が大部分を占めることになる<sup>8)</sup>。またHOを介したCOとビリルビンの生成量の量的関係はほぼ一致することから、病態時にはヘモグロビンを用いた酸素運搬体の代謝が急速に進むと高ビリルビン血症を呈することになる。またヘムの分解のスピードはショックなどのストレス状況下ではHO-1の誘導により大きく変化するため<sup>8)</sup>、体内に投与したヘモグロビンを用いた酸素運搬体の半減期は病態により大きく左右されるものと考えられる（図2）。一方正常肝臓ではNO

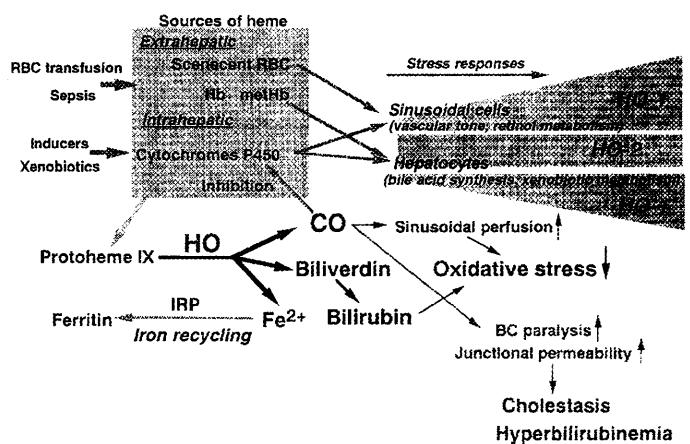


図2 heme oxygenaseによるヘムの酸化的分解とCOビリルビンの生成と肝臓機能の調節。

は主に類洞血管内皮細胞に生成活性が存在するが、内毒素ショックなどの病態ではKupffer cell や肝細胞に誘導型酵素活性が発現してNOの増加が起こり、血漿中ではNO<sub>2</sub><sup>-</sup>の濃度が上昇することが実験的に示されている。正常の肝微小環境においてはCO濃度がNO 濃度より極めて高いと考えられるが、ショックなどの病態下ではこれらのガス状物質が同時に過剰生成される場合があり、修飾ヘモグロビン分子の投与により、これらのガスの生理活性が大きく動搖する可能性が示唆される。また血漿中のNO<sub>2</sub><sup>-</sup>はヘモグロビンの強力なメト化物質であるため、内毒素血症ではヘモグロビンのメト化が正常に比べて促進することが実験的に確認されている（データ未発表）。

ラットにおける検討では、肝臓で定常状態で生成されているCOは、heme oxygenaseの拮抗阻害剤であるzinc protoporphyrin-IX (ZnPP)を投与すると検出できなくなる。この状態での灌流肝は約30%の血管抵抗の増加を示すようになる。ここに1 μM程度のCOあるいは8Br-cGMPを投与すると灌流圧の上昇は抑制されたことから、内因性に生成されるCOが、steady stateにおける肝血管抵抗の調節因子であることが示された<sup>2, 3)</sup>。この抵抗要素は門脈血管でなく類洞血管であることを、生体顕微鏡下の肝微小循環観察法で調べることができる<sup>3)</sup>。この際、類洞は不連続性の収縮を示すが、収縮部位が血管周皮細胞である伊東細胞に一致した。類洞には平滑筋細胞が存在せず、周皮細胞が収縮要素として作用すると考えられる。一方肝臓の類洞内皮細胞にはfenestrationと呼ばれる小孔が無数に存在しており、修飾ヘモグロビン分子が容易に通過して血管外空間や肝細胞へ自由にアクセスが可能な構造になっている。したがって正常肝臓ではいわゆる無細胞型ヘモグロビン分子は血管外から生成しているCOを捕捉して血管抵抗の増加を来すことが明らかになった<sup>7)</sup>。いわゆるthird spaceに逸脱したヘモグロビンはおそらくはリンパ系にdrainageされて、NOにより統御されているリンパ管の運動性にも大きな影響を与えるものと考えられるが詳細は不明である。

上記に示したラット肝を用いた検討ではNO、COをともに捕捉するoxyhemoglobinと、NOは捕捉できるがCOとの結合が起こらないmethemoglobin投与による血管反応の変化を比較したところ、oxyhemoglobinでは血管抵抗の上昇と類洞の狭小化が起こるが、methemoglobinではこれらの変化は起らなかった。興味深いことに類洞内皮細胞のfenestrationを通過することのできない250 nm程度のリポソームにoxyhemoglobinを封入し投与すると、血管抵抗の増加が起らなくなった。これらの所見から我々は肝実質細胞 (HO-2)で生じたCOの一部が血液中のhemoglobinに捕捉されることなく類洞壁外周を取り巻く伊東細胞に作用しそれを弛緩させることが、類洞血管のpatencyを保つために必要不可欠であると結論した。このことは同時に細胞型ヘモグロビン修飾体の開発が肝臓機能の恒常性を維持するために必要であることを同時に示唆している。細胞型ヘモグロビンにはリポソ-

ム内に種々のアロステリック物質を共存できるなどの利点もある一方でマクロファージによる分解を受けるため網内系の活性化やサイトカイン生成の刺激などの問題点も残されている。しかしながら体内に投与されたヘモグロビンは必ず解毒を受ける運命にあり、これが本来の代謝のコンパートメントで分解され通常の排泄経路から代謝されることはそれ自体重要なことであると思われる。その意味で、今後細胞型酸素運搬体を実用化するためには、メト化の抑制による酸素運搬能の維持と生体内半減期を延長させるためのさらなるステルス機能の付与が必要となろう。著者らは最近、リポソーム膜に脂質親和性の高い生体内抗酸化物質であるbilirubinをコーティングすると、NOによるリポソーム内ヘモグロビンの自動酸化が抑制されることを明らかにした。今後、ヘモグロビン機能を生かすためのリポソーム膜近傍の微小環境のデザインの最適化がさらに要求されよう。

## 文献

- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Suematsu, M., Kashiwagi, S., Sano, T., Goda, N., Shinoda, Y., Ishimura, Y. 1994. Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205 (2):1333-1337.
- Suematsu, M., Goda, N., Sano, T., Kashiwagi, S., Shinoda, Y., Ishimura, Y. 1995. Carbon monoxide: An endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* 96: 2431-2437.
- Suematsu, M., Wakabayashi, Y., Ishimura, Y. 1996. Gaseous monoxides: A novel regulator of microvascular function in the liver. *Cardiovasc. Res.* 32, 679-686.
- Yonetani, T., Tsuneshige, A., Zhou, Y., Chen, X. 1998. Electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies of alpha-nitrosoy hemoglobin: A novel oxygen carrier having NO-assisted allosteric functions. *J. Biol. Chem.* 273, 20323-20333.
- Maines, M.D. 1988. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2:2557-2568.
- Goda, N., Suzuki, K., Naito, M., Takeoka, S., Tsuchida, E., Ishimura, Y., Tamatani, T., Suematsu, M. 1998. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver: Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J. Clin. Invest.* 96, 2431-2437
- Suematsu, M., Ishimura, Y. 2000. The heme oxygenase-carbon monoxide system: A regulator of hepatobiliary function. *Hepatology* 31, 3-6.

# パーフルオロカーボン(PFC): 第2世代PFCによる挑戦

## Perfluorocarbon (PFC): Challenge with the second-generation PFC

仲井邦彦<sup>1)</sup>, 佐久間一郎<sup>2)</sup>, 福島昭二<sup>3)</sup>, 竹内由和<sup>3)</sup>, 佐藤 洋<sup>1)</sup>, 北畠 顯<sup>2)</sup>  
*Kunihiko Nakai<sup>1)</sup>, Ichiro Sakuma<sup>2)</sup>, Shoji Fukushima<sup>3)</sup>, Yoshikazu Takeuchi<sup>3)</sup>, Hiroshi Satoh<sup>1)</sup>, Akira Kitabatake<sup>2)</sup>*

### 和文抄録

パーフルオロカーボン(PFC)に関する最近の状況を概説した。PFC製剤の基本的な物理化学的および生物学的な性状を述べるとともに、第1世代PFCであるFluosolで得られた成果と残された課題、第2世代PFCであるOxygentでのその解決法について概略を述べた。さらにPFC製剤の将来展望として酸素治療とでもいべき分野を中心に、PFCの応用の可能性について言及した。

### Abstract:

Recent advances in the development of totally synthetic oxygen transporting fluids based on perfluorocarbon (PFC) are reviewed. The basic properties of PFC are outlined, together with the details of Fluosol as the first-generation PFC and Oxygent as the second-generation PFC. The multidisciplinary applications for PFC in medicine are described, including the potential use for oxygen therapeutics.

### Key words

Fluosol, Oxygent, Oxygen carrier, Perfluorocarbon, Perfluorochemical

### 1. はじめに

酸素運搬体候補として、ヘモグロビン (Hb) 系とパーフルオロケミカル (PFC) 系が有力である。PFCとしては、我が国のミドリ十字が世界に先駆けて開発したFluosol-DA 20% (Fluosol)が有名であり、1970年代後半から1985年にかけて世界中で臨床試験が行われた。残念ながらこの第1世代PFCであるFluosolは、臨床で酸素運搬体製剤としての評価を実証することができず既に姿を消しているが、その成果は第2世代PFCの開発へと引き継がれOxygent<sup>TM</sup>-HT (Oxygent, Alliance Pharmaceutical Corp.)の誕生に結実している<sup>1)</sup>。Oxygentは、酸素運搬体としての応用にとどまらず、画像診断における造影剤、腫瘍の診断と治療への応用、虚血性疾患における局所循環の改善、臓器保存など、現在多様な分野への応用が試みられており、欧米ではフェーズ3の臨床試験が進行中である。Fluosolの撤退以降、我が国における酸素運搬体開発はHb研究が主流となっているが、PFCも大きな可能性を秘めるものである。本稿ではこのPFC開発の現状を紹介し今後の課題と展望についてまとめてみたい。

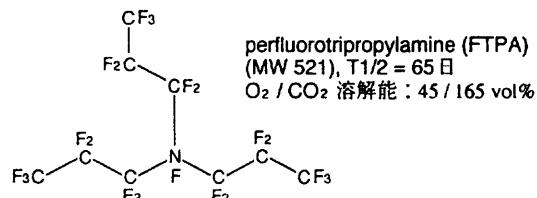
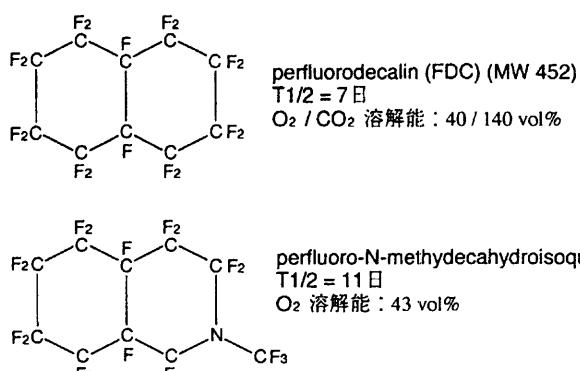
### 2. PFCの物理化学的および生物学的性状

PFCは一般式  $C_nF_m$  を有するフッ素化合物である。Fig.1に代表的なPFCの構造を示す。第1世代PFCでは環状構造、第2世代PFCでは直鎖状構造のPFCが選ばれた。PFCはほとんどのガスに対して高い溶解性を示し、生物学的にはきわめて不活性で生体内では分解を受けない。PFCが酸素運搬体として注目される理由はこの2つの物理化学的特性による<sup>2)</sup>。

PFCの酸素溶解能は水と比較すると約20倍高い。ヒト赤血球、PFCの酸素分圧変化に伴う酸素含量変化をFig. 2に示す。Fluosolによる酸素運搬は酸素ガスの溶解性によるものであり溶存酸素量は酸素分圧に比例して直線性を示す。Fig. 2ではFluosolに比べ第2世代PFCのOxygentの酸素溶解が高いように見えるが、これは後述するように製剤中PFC濃度の違いによるものであり、PFCそのものの酸素溶解能はFig. 1に示す通り大差はない。一方、Hbによる酸素運搬はシグモイド状を示し、酸素分圧が高い肺で効率良く酸素を結合し酸素分圧が低下する末梢組織において効率良く酸素を解離する。このHbによる酸素運搬はヘムによる酸素分子の結合に基づくものである。従って、ヘムに対して酸素

1) 東北大学医学系研究科 環境保険医学分野, 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1, Environmental Health Sciences, Tohoku University School of Medicine, Seiryō 2-1, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan, 2) 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科, 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目, Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine, N15 W7 kitaku, sapporo 060-8638, Japan, 3) 神戸学院大学薬学部製剤学, 〒651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬518, Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Science, Kobegakuinn University, 518 Ikawatani-cho, Nishiku, Kobe 651-2180, Japan

### 第1世代パーカーフルオロカーボン



### 第2世代パーカーフルオロカーボン

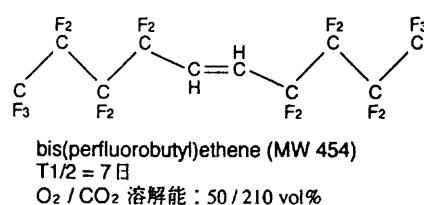
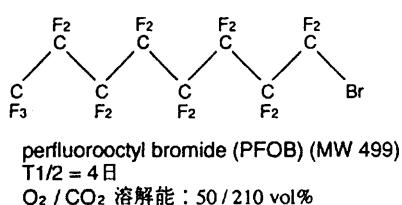


Fig. 1. 代表的なPFCの構造と生物学的半減期並びに酸素：二酸化炭素溶解能。第1世代PFCの代表がperfluorodecalinとperfluorotripropylamineからなるFluosolであり、第2世代PFCの代表がperfluoroctyl bromideからなるOxygentである。

よりも親和性が高いガス（例えば一酸化炭素や一酸化窒素）が存在するとHbは酸素と結合しえず酸素運搬能を失う。Hb系酸素運搬体は副作用として血管収縮が認められるが、この機序もHbによる一酸化窒素結合であり、一酸化窒素が内因性の血管弛緩物質であったことによる<sup>3)</sup>。PFCではこのようなガスが存在しても酸素溶解性に変化はなく酸素運搬が可能である。また、精製されたHb誘導体では赤血球内酵素を失っており二酸化炭素運搬能を持たない。PFCは二酸化炭素をも効率良く溶解し運搬することが可能である（Fig. 1）。なお、PFCのガス溶解能を効率よく利用するために、呼吸ガスは高濃度酸素かcarbogen (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) が用いられる。

酸素運搬体としてPFCが注目される第二の特性は、化学的安定性と生物学的不活性にある。PFCの炭素—フッ素結合はエネルギー準位が高く安定であり（炭素—フッ素の結合エネルギーは128 kcal/molであるのに対し、炭素—水素結合は81 kcal/mol）、炭素—炭素結合はフッ素が形成する疎水性環境により保護され、酵素的な生物学的代謝を受けない。このためPFCは生体内で分解を受けず生物学的に不活性である。

PFCは疎水性であるために水溶液とするには界面活性剤による乳化を行い粒子として分散させる必要がある。従ってPFC製剤は酸素溶解能を担うPFCと、エマルジョン形成のための界面活性剤、血中投与のために電解質、糖、必要ならばコロイドな

どの三つの要素から構成される。このPFC製剤の安定性は粒子としての安定性に依存しており、粒子の融合、崩壊をどのように回避するかがPFC製剤の大きな課題となり、後述するように第2世代PFCといわれるものの最大の改良点もこの粒子の安定性にあった<sup>4)</sup>。

PFCの血中半減期を規定する最大要因は網内系による貪食であり、Fluosolの血中半減期はヒトで6~24時間、投与量が増えるに従い半減期は延長する。Oxygentでは動物実験によるデータであるが6 mL/kg の投与で48時間と報告されている。PFCは網内系に取り込まれ最終的には呼気から蒸気として排泄されるが、生体内で酵素的代謝を受けず、尿、糞便には排泄されない。従って網内系に残存する生物学的半減期を規定する最大の要因は呼気への排泄速度であり、PFCの蒸気圧に比例、分子量に反比例し、脂溶性の程度により影響される。

PFCによる重大な副作用は今のところ報告されていない。しかし、一過性の発熱、悪寒、頭痛、嘔吐などを主徴とするflu-like syndromeと呼称される症状が表れる。最近の報告ではこの原因はPFCが網内系に貪食され、マクロファージが活性化し放出反応を惹起するためと考えられており、原因物質としてプロスタグランジン、トロンボキサン、インターロイキンが想定され<sup>5)</sup>、ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン、ロイコトリエン、免疫反応、補体活性化、血小板活性化などの関与は否定さ

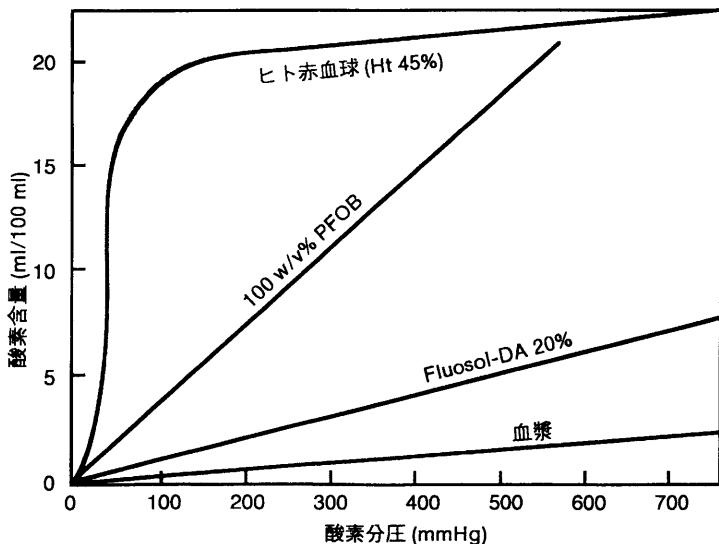


Fig. 2. 血液, 血漿, Oxygenent, Fluosolの酸素分圧変化に伴う酸素含量の推移。末梢血酸素分圧を45 mmHgとすると、酸素運搬効率は吸入ガス酸素分圧で与えられる酸素含量と45 mmHgにおける酸素含量の較差より求められる。文献2)より改変。

れているようである。組織学的にはマクロファージの肥大が顕著となる。このような生物学的反応は異物の貪食によって一般的に引き起こされるものと解され、PFCは生物学的に不活性であり、それだけ反応は一過性で程度も軽く可逆的であるという。ただし、後述するように最近になって血小板減少が見られるとも報告されており、副作用に関して未解明な部分が残る<sup>6)</sup>。

### 3. 第1世代PFC—Fluosolの開発

PFCが酸素運搬体として利用できることを初めて示したのは、1966年にClarkとGollanが行った動物実験であり、PFCによる液体呼吸が可能であることを証明した<sup>7)</sup>。彼らはまた摘出心臓の灌流実験をPFCで行い、PFCが血液の替わりに赤血球代替物としても有効であることを示した。この実験事実に基づいてミドリ十字が開発したものがFluosolである。14% perfluorodecalin (FDC)と6% perfluorotripropylamine (FTPA)をPluronic F-68と卵黄レシチンによりエマルジョンとしたものである (Table 1)<sup>8,9)</sup>。FDCは排泄速度が速くPFCとしては優れているが乳化性に難があり、乳化性が良いFTPAとの混合が行われた。しかしそれでもFluosolは安定性が悪く冷凍保存が必要であり、使用時に解凍し電解質溶液と混和して使用される。

Fluosolは動物実験で安全性が確かめられた後、70年代後半から80年代にかけて我が国を中心に世界的に主に宗教上の理由から輸血を拒否する症例で700例を越す臨床試験が行われた。この間の成績は、我が国<sup>10)</sup>および米国<sup>11)</sup>からそれぞれ報告されている。Fluosolの最大の問題点は酸素運搬能の不足であり、Fig. 2

からもうかがわれるよう第2世代PFCや赤血球と比較して必ずしも十分な酸素運搬能をもつものとはいえない。これは粒子としての安定性に欠けPFC濃度を上げることができなかつたことに起因すると考えられる。また、FluosolはPFC製剤としての安定性を増すためにFTPAが加えられたが、このFTPAの生物学的半減期は65日と長く蓄積性を示す。乳化のために界面活性剤として用いられたPluronic-F68は補体活性化を惹起することも示された<sup>4)</sup>。以上から、Fluosolは、PFCの主剤であるFDCそのものではなく乳化に伴う様々な要素に関連した困難を抱えていたことが理解される。このような事情から、Fluosolの酸素運搬体としての有効性は認められながらも、製剤としての用途には限界があることが明確となった<sup>9)</sup>。Fluosolは、終盤は心筋梗塞の治療法の一つである経皮的冠動脈拡張術 (PTCA)への応用として精力的に研究され、1989年にFDAより製造承認を受け英米で販売されるが、需要が少なく、1993-1994年に事实上の製造中止が決まっている。

Fluosolで得られた知見は、しかしながら、PFCにより酸素を組織に供給することができ、PFCを血中に投与しても重大な副作用は起きないことを示すものであり、PFCの潜在的な可能性そのものについては肯定的な成果を示したものと考えられる。

このFluosolに関しては故 薄場博士が本誌に詳しい総説<sup>12)</sup>を寄稿されているので、参考にされたい。

### 4. 第2世代PFC—Oxygenentの開発

#### 4.1. Oxygenentの概要

Alliance Pharmaceutical Corp.により商品開発されたOxygenentはperfluoroctyl bromide (PFOB、またはPerflubronと称される)を主剤とするものであり、PFCに臭素が含まれる。乳化は卵黄リン脂質による (Table 1)。Fluosolと比較したOxygenentの性能面での特徴は、酸素運搬能の改善と生体内半減期短縮である。Oxygenentは粒子の安定性に優れており、PFC濃度を90w/v %まで上げることが可能となりFluosolに比較して酸素運搬能は顕著に改善された (Fig. 2)。Oxygenentの酸素溶解能は3.15 mL O<sub>2</sub>/dLであるのに比し、Fluosolは0.6 mL/dLでありその差は歴然としている。ただし、これはTable 1でも明らかなように、PFCそのものの酸素溶解の差によるものではなく、エマルジョン製剤中PFC濃度の改善によるものであり、それはまさに製剤技術の改善に起因するものである。Oxygenentのもう一つの改良点は生体内半減期の短縮であり、そのPFCであるPFOBは4日程度である。ただし、FluosolもFDCのみでは半減期はPFOBと変わらない。すなわち、Fluosolの長期蓄積性という欠点は、FDCのみでは乳化できずFTPAと合成界面活性剤を添加せざるを得なかつた当時の製剤技術の水準をやはり反映するものである。PFC開発では、エマルジョン製造技術の進展が大きな鍵を握ることが強調される。

Oxygenentのその他の特徴として、粒子安定性が優れているため、室温での長期保存が可能であり、滅菌も容易である。レシ

チン以外の界面活性剤も用いられていない。粘性はFluosolよりも高く、末梢血管に匹敵するshear rate 1秒<sup>-1</sup> (25°C) では、Fluosolの6.7 cpに対して、Oxygentでは100 cpを越えるともされ、毛細血管での流動性が悪くなるのではないかとの懸念も指摘されている<sup>13)</sup>。ただし、この点についてはAllianceから詳細な見解は出されていないようであり、Hb系製剤でも粘性に関する許容範囲は議論の多いところであり今後の課題ではなかろうか。Oxygentも安定と述べたが、Oxygentは臭素を含み、網内系に貪食後はチトクロームP450酵素が臭素の切り出しに作用するとの報告<sup>14)</sup>があり詳細は明らかではない。

#### 4.2. Oxygentの酸素運搬能

酸素運搬能に関しては、実験的な出血性ショックでは血圧5 mmHgまで脱血し晶質液のみを投与した場合とOxygent 6 mL/kgを加えた場合の24時間生存率はそれぞれ12.5%と43%であったという<sup>15)</sup>。5%アルブミンによる交換輸血の際にOxygentを併用し12 mL/kgまで投与しても特に重大な副作用はないとも記載されている<sup>16)</sup>。さらに、血液希釈の考え方から外科手術時にOxygent 1 mL/kgを投与することにより平均動脈血圧の上昇、心拍出量の改善、酸素供給及び酸素消費量の改善など、明らかな臨床効果が認めら<sup>17)</sup>、犬での血液希釈モデルでもPFC併用により自己血Hbを3 g/dLまで下げても良好な循環動態を維持できたとい<sup>18)</sup>。

ここでOxygentを含むPFC製剤の用途について、赤血球との共存時における効果を考察したい。すなわち、Oxygentで注目される重要な点は、出血によりHb値が低下した状態で少量のOxygentを併用した場合に期待される効果であり、理論的な計算では、70 kg程度の体重の患者に3 mL/kgで投与した場合を想定すると、呼吸ガス酸素分圧500 mmHgではOxygentは全体として34.4 mLの酸素を溶解可能である。1単位の赤血球製剤（我が国の2単位程度）と比較すると、そこには58.5 gのHbが含まれているから78.4 mLの酸素を結合可能であり、3 mL/kgという投与量は0.4単位の輸血に相当することとなる。しかし、肺と末梢組織における酸素分圧の差から赤血球が放出できる酸素は赤血球が結合する酸素の21%に過ぎず、従って赤血球による実際の酸素運搬量は15.7 mLである。一方、Oxygentは溶存酸素の91%を放出するため、31.2 mLの酸素を放出し、酸素運搬効率を換算するとこれは2単位の赤血球輸血に匹敵する効果をもたらすと推測されることになる。出血によりHbが6 g/dLに減少した場合、代償的に心拍出量などのパラメーターが変わり血漿による酸素運搬量は上昇するため、実際のOxygentによる酸素運搬効

Table 第1世代PFC(Fluosol)と第2世代PFC(Oxygent)の比較。文献<sup>4, 13)</sup>より改変。

	Fluosol	Oxygent
Perfluorocarbon		
純度	FDC ~98%	PFOB >99%
	FTPA ~85%	
排泄速度(T1/2)	FDC ~7日	PFOB ~4日
	FTPA ~65日	
界面活性剤	Pluronic F-68 (2.7%) レシチン (0.4%)	レシチン (4%)
エマルジョン特性		
濃度	20 w/v%	60~90 w/v%
酸素溶解能	~6 vol%	17 vol% (PFC 60% w/v%)
(pO <sub>2</sub> 760 mmHg)		25 vol% (PFC 90% w/v%)
保存性	凍結保存	室温で1年以上
電解質※	Krebs-Ringer bicarbonate	生理食塩水
pH	7.3	7.1
粘性(20 sec <sup>-1</sup> )	2.7 cp (37°C)	8 cp (60% w/v%, 25°C) 22 cp (90% w/v%, 25°C)
滅菌操作	115°C以下で滅菌	121°Cの常法滅菌可能
使用準備	投与前に3成分を混合	調製済み

※Fluosolではさらにコロイド物質を加えて膠質浸透圧調節が可能。

率はもっと高いものになろう。

Oxygentを整形外科領域に適応した欧州におけるフェーズ2研究の結果が昨年報告された。そこでOxygentの投与量も0.9-1.8 g/kgであり、輸血トリガーへの遅延効果が立証されている。その詳細は本誌前号に土田ら<sup>19)</sup>、および高折<sup>20)</sup>によって論評されているので参考にされたい。

#### 4.3. 自己血貯血への応用

ただし、PFCを含む酸素運搬体製剤の血中半減期は赤血球に比較して短く、特にOxygentは急速に体外に排泄される。従って、出血量が多い場合、患者への同種血輸血を避けることは本質的に不可能である。前述の欧州整形外科医領域における臨床試験でも、最終的に投与された同種血輸血量はOxygent群と対照群で差がなく、endpointを同種血回避に設定した場合、残念ながらOxygentの利点は見出せない。Hb系酸素運搬体では、同種血輸血回避のみをendpointとすることさえもFDAから批判されている事情を考えると<sup>21)</sup>、輸血トリガー遅延のみをendpointとするプロトコールに関しては疑問を禁じ得ない。

このような事情はAlliance社も理解していると思われ、Alliance社のHome page\*上で展開される最近の議論は自己血輸

(\*<http://www.allp.com/press/press.exe?@N991401> を参照)。

血支援に向けた戦略に重点を置くことを強く示唆している。Alliance社は術前貯血と血液希釈を応用する自己血支援プロトコールを開発し，“Augmented Acute Normovolemic Hemodilution”(Augmented-ANH)と命名、特許取得も行っている。このAugmented-ANHの基本は、術前に自己血貯血を行うとともにOxygentを投与し血液希釈を実施、術中の循環動態維持をPFC製剤によって行い、患者は術後に自己血の返血を受けるものである。このプロトコールにより同種血への曝露を回避することができる。Oxygent 1 g/kgの投与がHb 1.5 g/kg程度と同等の酸素運搬能を有したと報告されていた<sup>21)</sup>。なお、この特許申請では権利主張の範囲をPFCにとどまらずHb系を含む全ての酸素運搬体全般に対して申請していることも注目される。

Alliance社は、2000年5月12日にOxygentの販売権をBaxter社に委託し、自己血輸血の推進に乗り出すことを発表しており、Oxygentの主な標的の一つをこのAugmented-ANHに絞りつつある（そのかわりにBaxter社はOxygentのフェーズ3研究遂行に資金的援助を行うこともうたわれている）。血中半減期が短い点は、酸素運搬体の全てが共通に有する本質的な欠点である。Alliance社のこの挑戦はそのジレンマへの一つの答えであるかもしれない。FDAが同種血回避をその主なendpointとするこの製剤に対して、どのような対応を行うのか、成り行きに興味を持たれる。

なお、Oxygentそのものの臨床試験は、欧州8カ国で癌、泌尿器、血管、整形外科、その他の外科領域におけるフェーズ3研究、北米で体外循環による冠動脈バイパス術への応用のフェーズ3研究が進められている。整形外科以外の領域でもAugmented-ANHが試みられているかは不明である。

#### 4.4. Oxygentの生体適合性

Oxygentを用いたある臨床試験の成績では、57名の健常人および30名の外科患者に最高1.8 g PFC/kgまで投与され、安全性については投与後4-6時間後に1-1.5 °Cの発熱と若干の血小板減少が見られることが確認されている<sup>22)</sup>。前述の欧州での整形外科領域における報告でも、flu-like syndromeや血小板減少があるものの、許容できる範囲の副作用であったとされている<sup>23)</sup>。Augmented-ANHに関する論文発表はまだないが、血小板減少に関しては血小板数はOxygent投与で急速に減少し、数日後にリバウンドで術前の2倍程度に増加、一週間程度で正常値に回復するというものであった。欧州の臨床研究でも血小板減少はOxygent群で最も顕著であり、土田らもそれ故に繰り返し投与の危険性を指摘している<sup>19)</sup>。このような血小板減少から想起される背景要因として、生体内での血小板活性化が強く示唆される。この点については、しかしながら、Alliance社自身によって血小板を用いた若干の安全性検査が行われており、凝集能と細胞内カルシウム動員から見た場合、Oxygent、Fluosolを含めPFCは血小板抑制に働くことが示唆されている<sup>24)</sup>。では、血小板減少の機序は何であろうか？Oxygentによる血小板減少について、その詳細な解析が問われている。

Flu-like syndromeについては、前述の通り背景に網内系活性化が強く示唆されており、エマルジョン製剤にとって本質的な

副作用と考えられる。この場合、Oxygent粒径を0.12 μm以下に制御すると発熱反応が消失し、また粒径を0.20 μm以下とすることで血中残留時間の明らかな延長があるという<sup>25)</sup>。Fluosolでも粒径制御の重要性が指摘されており、あらためてPFC粒子の粒径制御が効果と安全性の上で密接に関係していることを示す結果である。ただし、in vivoでのPFCによる網内系活性化に対し、in vitroでは様子は若干異なる。Oxygentはマクロファージによるサイトカイン産生を抑制し<sup>26)</sup>、好中球も多くのPFCで活性酸素生成が抑制され<sup>27)</sup>、Oxygentで好中球走化性が抑制される<sup>28)</sup>。従って、in vitroでの実験結果は、PFCによる生体内網内系活性化という解釈と若干矛盾する。また、Fluosolではflu-like syndromeに関してはあまり記載が見られず、PFCの違いで網内系への侵襲度が異なるのかもしれない。このflu-like syndromeについては、Hb系酸素運搬体でもリポソーム系では同様な現象が見られる可能性があり、粒子系の人工物では網内系活性化の意味とその結果、さらにはそのような反応を回避する方法論上の戦略を明確にすることが問われているかもしれない。

最後にFluosolでは補体活性化が問題となつたが、Oxygentを含め最近のPFCでは補体活性化の報告はない<sup>29)</sup>。乳化に用いられた材料のみならず、エマルジョンの安定性も補体活性化に寄与するという<sup>30)</sup>。

PFCの安全性、生体適合性に関しては、基礎検討が未だ不十分であり、臨床評価での判断もさることながら、製剤の設計を踏まえた慎重な解析が望まれよう。

#### 5. その他の第2世代PFC

Oxygentをさらに改善する方法として、エマルジョンをより安定化させる新しい方法が提案されている。具体的にはPFC自体より疎水性が強い物質を添加し、リン脂質の疎水性部分とPFCとの分子つなぎとして応用し粒子の安定性を増す方法である。Perflubronのエマルジョンを作成する際にリン脂質単独とC<sub>6</sub>H<sub>10</sub>では室温での保存日数とともにエマルジョンの融合が顕著であるのに対し、分子つなぎを加えた場合、長期に渡って粒子の大きさは変わらない<sup>31)</sup>。

Oxygent以外の直鎖PFCを用いる後発品に、Du Pont Merck Pharmaceutical Companyが開発するTheroxがある。Theroxの主剤は正確にはPFCではなく分子中央に水素を2個持つbis(perfluorobutyl)ethaneであり(Fig. 1)，水素が分子中に埋もれて生体内酵素による攻撃を受けずに代謝されることなく体外へ排泄される<sup>13)</sup>。PFC濃度は83 w/v%，レシチン単独で乳化し、室温保存、PFCの生体内半減期は7日程度とされている。

HemaGen/PFC社と3Mの協力で開発されたPFCにOxyfluorがある。Perfluorodichlorooctane(PFDCO)を主剤としPFC濃度は40 w/v%，卵黄レシチンとsafflower oilで乳化されている。Oxyfluorの酸素溶解能は17.2 mL/dL。1年間の室温保存が可能。実験動物での出血性ショックに有効とされ<sup>32)</sup>、すでにフェーズ1が終了したが大量使用時に副作用が見られたという<sup>6)</sup>。

その他、旧ソ連アカデミーのFutorosanやロシア圏の文献にPerftoran、PerfluoranなどのPFCが散見されるが、粒子安定性やPFC濃度など詳しい情報が入手できず割愛した。

## 6. PFCの臨床適用範囲の拡大

赤血球輸血代替ではなく酸素治療とでも言うべき新しい分野にPFCを応用することが試みられている。すでにFluosolでPTCAへの応用が模索されたが、Oxygentの登場によりこの傾向に一層拍車がかかった。臓器灌流液にとどまらず、腫瘍診断と治療、造影剤など多様な分野で臨床応用を目指した研究が行われている<sup>33)</sup>。実際に、Oxygentに使われたperflubronは使用目的に合わせ血管造影用にImagent™-BP、消化管造影用にImagent™-GI、肺呼吸用にLiquiVent™などとして開発され、それぞれ現在臨床試験が進められている。

### 6.1. 灌流による特定臓器酸素化

PFCを最初に灌流モデルに用いたのはやはりClarkらがラット摘出心をFX-80により灌流したことから始まる。PFCは低粘度であるため、微小血管における流体特性に優れ血管抵抗が小さいことから灌流に適した酸素運搬体とされている(Fig. 3)。またPFCは粒径が小さく、赤血球では通れない栓塞部位の血管にも流れ組織を低酸素症から保護し非可逆的な障害の予防に有用と期待された<sup>2), 34)</sup>。

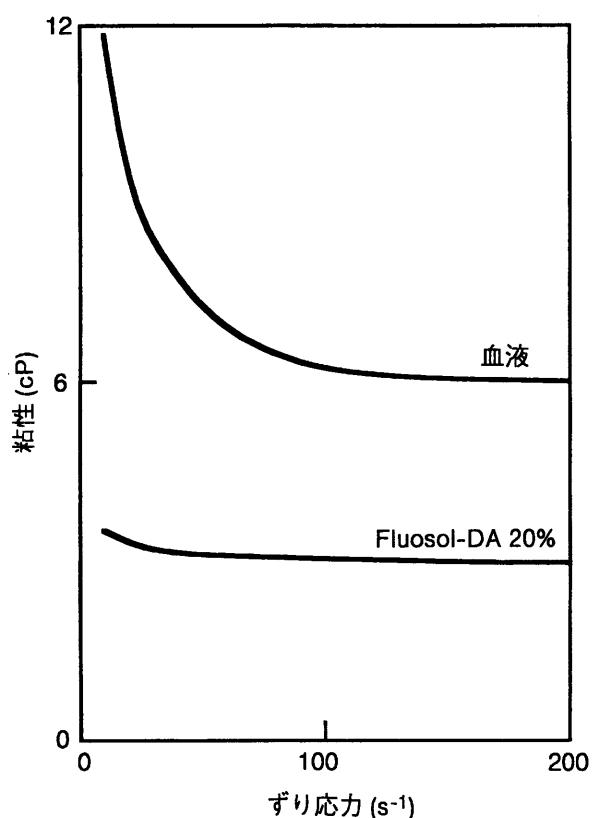


Fig. 3. 血液 (Ht 45%) 及びFluosolの粘性とずり応力の関係。Fluosolはずり応力に関係なく粘性は低く保たれ、灌流液としての潜在的有用性を示す。文献<sup>2)</sup>より引用。

脳の灌流モデルにFluosolを用いた場合、代謝、電気生理学的活動性の維持に有効であるばかりではなく、主要な脳血管の障害を予防する効果が認められている<sup>35)</sup>。PFCは毛細血管から組織へ酸素供給する効率が良いためと推測されている。

冠循環の灌流モデルではPFCは循環血液量を増し心筋細胞への酸素供給を有意に改善するため<sup>36)</sup>、冠血管形成術の際に灌流液として用いることで心筋収縮障害を回避できることが示された<sup>4, 37)</sup>。実際にFluosolについては、PTCAにおける局所灌流液として用いる方法が米国と英国すでに認められている<sup>2, 38)</sup>。また、急性心筋梗塞の際の再灌流障害を防ぐ目的で、米国ではFluosolを用いてThrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction 9 Trial (TAMI 9) として、randomized prospective studyが行われた。結果はtPA単独投与の対照群に比較して残念ながらFluosol併用による有意な効果は認められず、肺浮腫などは逆にFluosolで増加した<sup>39)</sup>。ただし、動物実験では実験的血管閉塞後にOxygentを加えて灌流することで梗塞病変の縮小や心機能の維持回復が見られたとされている<sup>40)</sup>。酸素運搬能が高いPFC製剤では、救急医療における治療成績の改善に貢献する可能性を秘めるかもしれません、今後の検証が強く期待される。ただし、梗塞時の予防を期待してあらかじめFluosolやOxygent等を投与し動物で実験的血管閉塞を行っても効果は少ないか見られないという<sup>41)</sup>。Therox<sup>42)</sup>やOxyfluor<sup>43)</sup>でも冠循環など局所臓器への酸素化的応用検討が進んでいる。この分野は酸素治療としてPFCに期待される大きな分野になりつつある。

### 6.2. 放射線による腫瘍治療への応用

一般に腫瘍は低酸素状態にあり放射線照射に対して抵抗性を示す。PFCは赤血球よりもはるかに小さく、赤血球では到達不可能な血管から離れた腫瘍組織内低酸素部位にまで酸素を供給することが可能であり、放射線治療への感受性を高めるための検討が行われている。

実験的には腫瘍細胞を実験動物に接種し、放射線治療を行う際にPFCを投与、酸素供給を高めるために100%酸素呼吸もしくはcarbogenによる呼吸が併用される。Rockwellら<sup>44)</sup>はBA1112 rhabdomyosarcomasをラットに接種し、100%酸素呼吸の条件下Oxygentを4 mL/kg投与すると腫瘍細胞の生存が1 log程度低下することを明らかにしており、同様な報告は多い<sup>45, 46)</sup>。抗腫瘍効果はOxygentで顕著であるが、Therox<sup>47)</sup>、Fluosol<sup>48)</sup>、FMIQ (20w/v % perfluoro-N-methyl decahydroisoquinoline emulsion, Alpha Therapeutic Corp.) でも報告されている。

### 6.3. 画像診断へのPFCの応用

Perflubronは末端の臭素原子が放射線不透性であり、X線撮影の際の造影剤として利用可能である。Perflubronを造影剤として初めて用いたのは消化管造影であり、この場合はエマルジョンではなく100% perflubronの経口投与が行われた。その後血管造影用にエマルジョン化が行われ腫瘍の診断と治療に応用されている<sup>2)</sup>。一方、フッ素は生体内にはほとんど存在しない物質であり、PFCは網内系に特異的に集積するため<sup>19</sup>F-MRIによる網内系臓器の描出が可能である。また、腫瘍細胞そのもPFCを取

り込まないが、腫瘍組織周辺に存在するマクロファージがPFCを取り込むため腫瘍の画像化も試みられている<sup>48)</sup>。増感剤としてはヨウ素を含むPFC ( $C_6F_{13}CH=ClC_6H_{13}$ ) も開発されており、臭素より優れているという<sup>49)</sup>。

PFCによる画像診断は何をPFCにより映し出すのかその方法論にもよるが、組織生理学の非侵襲的な道具としての利用、低酸素症に関連した障害の診断、腫瘍における低酸素状態の診断、など様々な分野に応用が可能と期待されている。

#### 6.4. 臓器保存と移植への応用

臓器保存の主流は低温保存により代謝を停止させ細胞内液組成で灌流する方法であるが、低温保存は再加温時に浮腫や組織構造の変化を惹起し、血管収縮、細胞内アシドーシスを招きやすく<sup>50)</sup>、移植後に虚血を引き起こす<sup>51)</sup>。そこでOxygentによって25-30°Cで保存し酸素消費を維持する試みが行われている<sup>52)</sup>が、臓器生着の成績は低温保存と比較してまだ改良が必要とされている。なお、臓器の低温灌流保存時に細胞内液であるUW液とPFC(Fluosol)を併用することにより再加温による障害を予防する試みもあり<sup>53)</sup>、こちらのほうは効果が示されている。臓器保護効果におけるPFCの役割について、酸素供給以外の未知の要因も考えられるという。

移植に際し、免疫操作によって拒絶反応を制御する目的でPFCを応用する試みもなされている。移植を受ける際にPFCを前投与した場合、急性拒絶反応に関わる白血球の反応性が抑制される<sup>54)</sup>。異種移植における肝移植実験でも、PFCの事前投与によって拒絶が遅延し活性化補体成分の移植片への結合が抑制される<sup>55)</sup>。

#### 6.5. その他の適用拡大

PFCによるガス溶解性を応用して、潜水病<sup>56)</sup>や開心術<sup>57)</sup>における空気栓塞除去の試みがある。Oxygentは液体呼吸用にLiquiVentが開発され、PFCが肺胞表面張力を下げるとともに気管の空気抵抗を減少させ、ガス交換を促進させるとともに強制換気時に起こりやすい気管の圧力障害の予防に効果があることが報告されている<sup>4)</sup>。呼吸器へのPFC投与は気管造影や薬剤投与にも利用可能かも知れない。また、PFCは高密度リポ蛋白からコレステロールやトリグリセリドを引き抜く作用があり<sup>58)</sup>、この特性を治療に応用しようとする試みも見られる<sup>59)</sup>。

#### さいごに

我が国ではFluosolの製造と供給が停止されて以後、各研究者が備蓄していたFluosolを用いた研究は継続されるものの、PFC開発そのものは途絶え過去の研究となりつつある。第2世代PFCが有する機能は目を見張るものがあり、本稿で述べてきたように、Fluosolにおける様々な問題点も、それはあくまでFluosolの製剤技術に関わるものであり、PFCそのものの可能性を否定するものではないことは明らかである。既存の輸血システムでは手が届かない分野、例えば酸素治療とでもいうべき方法論を開拓し、多枝選択の拡大<sup>60)</sup>と輸血医療／酸素治療の発展に寄与する日が来ることを期待したい。

#### 謝辞

本稿は、1996年に人工血液と題する本を出版するという故関口定美先生（北海道赤十字血液センター）の意向で、当時はPFC研究に関与していなかった筆者（仲井）が指名され、資料に基づき執筆したものを下地に、最近の状況を加筆したものである。個人的なことで恐縮であるが、関口先生に朱を入れていただいた最後の原稿となった。様々な事情で本稿は出版の機会が失われ、今回本誌編集部の好意であらためて寄稿させて頂いた。本稿タイトルは関口先生と相談して決めたものをそのまま採用させて頂いたが、今でも状況を的確に表現している。当時、PFC資料を収集し感じたことは、何故国内ではPFC研究を誰も引き継がなかったのか、という疑問であった。その後、我々は新規乳剤技術の確立を経て新しいステルス性PFCの開発に乗り出したのであるが（その詳細は次号以下を参照されたい）、関口先生の薦めでPFCに目を向けたことがその一つの重要な契機であり、Hb研究とともにあえてPFC研究を開始する決断の理由ともなった。あらためて本稿を故関口定美先生に捧げ、感謝の言葉をしたい。

#### 参考文献

1. 関口定美, 仲井邦彦. 人工血液の歴史と現状. 日常診療と血液 1994; 4: 7-12.
2. Lowe K. Synthetic oxygen transport fluids based on perfluorochemicals: applications in medicine and biology. Vox Sang 1991; 60: 129-40.
3. 佐久間一郎, 仲井邦彦, 富樫廣子, 坂野上淳, 藤井聰, 吉岡充弘, 佐藤洋, 北畠顕. ヘモグロビンと一酸化窒素との相互作用を考慮したヘモグロビン系酸素運搬体の設計. 人工血液 1999; 7: 40-4.
4. Riess J. The design and development of improved fluorocarbon-based products for use in medicine and biology. Artif Cells Blood Substit Immobil 1994; 22: 215-34.
5. Flaim S. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994; 22: 1043-54.
6. Winslow R. New transfusion strategies: red cell substitutes. Annu Rev Med 1999; 50: 337-53.
7. Clark L, Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. Science 1966; 152: 1755-6.
8. Yokoyama K, Yamanouchi K, Suyama T. Recent advances in a perfluorochemical blood substitute and its biomedical application. Life Chem Rep 1983; 2: 35-93.
9. 横山和正, 津田良夫. 酸素運搬液“フルオゾール”. In: 水島裕. ed. DDSの進歩1995-96. 東京: 中山書店, 1995; 228-31.
10. Ohyanagi H, Saitoh Y. Development and clinical application of perfluorochemical artificial blood. Int J Artif Organs 1986; 9: 363-8.
11. Spence R, Norcross E, Costabile J, McCoy S, Cernaiaru A,

- Alexander J, Pello M, Atabek U, Camishion R. Perfluorocarbons as blood substitutes: the early years. Experience with Fluosol DA-20% in the 1980s. *Artif Cells Blood Substit Immobil* 1994; 22: 955-63.
12. 薄場彰. 人工血液としてのperfluorochemical(PFC)乳剤の評価. *人工血液* 1994; 2: 9-14.
  13. 山内紘一. ペルフルオロケミカル酸素運搬体の開発状況と展望. In: *人工臓器1994-96*. 東京: 中山書店, 1994; 114-9.
  14. Obraztsov V, Grishanova A, Shekhtman D, Sklifas A, Makarov K. Interaction of perfluorooctylbromide with liver microsomal monooxygenase. *Biokhimia* 1993; 58: 1234-9.
  15. Stern S, Dronen S, McGoron A, Wang X, Chaffins K, Millard R, Keipert P, Faithfull N. Effects of supplemental perfluorocarbon administration on hypotensive resuscitation of severe uncontrolled hemorrhage. *Am J Emerg Med* 1995; 13: 269-75.
  16. Johnson E, Erickson B, Podolsky A, Birks E, Keipert P, Faithfull N. Effects of a perfluorocarbon emulsion for enhanced O<sub>2</sub> solubility on hemodynamics and O<sub>2</sub> transport in dogs. *J Appl Physiol* 1995; 79: 1777-86.
  17. Cernaianu A, Spence R, Vassilidze T, Gallueci J, Gaprindashvili T, Olah A, Weiss R, Cilley J, Keipert P, Faithfull N. Improvement in circulatory and oxygenation status by perflubron emulsion (Oxygent HT) in a canine model of surgical hemodilution. *Artif Cells Blood Substit Immobil* 1994; 22: 965-77.
  18. Habler O, Kleen M, Hutter J, Podtschaske A, Tiede M, Kemming G, Welte M, Corso C, Batra S, Keipert P, Faithfull N, Messmer K. Hemodilution and intravenous perflubron emulsion as an alternative to blood transfusion: effects on tissue oxygenation during profound hemodilution in anesthetized dogs. *Transfusion* 1998; 38: 145-55.
  19. 土田英俊, 酒井宏水. Perflubron乳剤投与で整形手術時の輸血を遅延させることができる. *人工血液* 2000; 8: 21-5.
  20. 高折益彦. 赤血球代替物としてのPerflubron治療論文への論評. *人工血液* 2000; 8: 26-8.
  21. 伸井邦彦. 「酸素治療および赤血球代替物の安全性ならびに有効性評価基準に関するワークショップ」に参加して. *人工血液* 1999; 7: 112-6.
  22. Keipert P. Use of Oxygent, a perfluorochemical-based oxygen carrier, as an alternative to intraoperative blood transfusion. *Artif Cells Blood Substit Immobil* 1995; 23: 381-94.
  23. Spahn D, Brempt R, Theilmeier G, Reibold J, Welte M, Heinzerling H, Birck K, Keipert P, Messmer K. Perflubron umulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. *Anesthesiology* 1999; 91: 1195-208.
  24. Smith D, Lane T. Effect of high concentration perflubron emulsion on platelet function. *Biomater Artif Cells Immobiliz Biotechnol* 1993; 21: 173-8.
  25. Keipert P, Otto S, Flaim S, Weers J, Schutt E, Pelura T, Klein D, Yaksh T. Influence of perflubron emulsion particle size on blood half-life and febrile response in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 1169-74.
  26. Thomassen M, Buhrow L, Wiedemann H. perflubron decreases inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Ctic Care Med* 1997; 25: 2045-7.
  27. Shekhtman D, Safranova V, Skifas A, Alovskaya A, Gapeev A, Obraztsov V, Chemeris N. Perfluorocarbon emulsions and other corpuscular systems influence on neutrophil activity. *Biofizika* 1997; 42: 1260-6.
  28. Rossman J, Caty M, Rich G, Karamanoukian H, Azizkham R. Neutrophil activation and chemotaxis after in vitro treatment with perfluorocarbon. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 1147-50.
  29. Rosoff J, Soltow L, Vocelka C, Schmer G, Chandler W, Cochran R, Kunzelman K, Spiess B. A second-generation blood substitute (perfluorodichlorooctane emulsion) does not activate complement during an ex vivo circular model of bypass. *J Cardiothor Vasc Anesth* 1998; 12: 397-401.
  30. Sedova L, Kochetygov N, Berkos M, Pjatowskaja N. Side reaction caused by the perfluorocarbon emulsions in intravenous infusion to experimental animals. *Artif Cells Blood Substit Immobiliz Biotechnol* 1998; 26: 149-57.
  31. Postel M, Riess J, Weers J. Fluorocarbon emulsions- the stability issue. *Artif Cells Blood Substit Immobil* 1994; 22: 991-1005.
  32. Goodin T, Grossbard E, Kaufman R, Richard T, Kolata R, Allen Jv, Layton T. A perfluorochemical emulsion for prehospital resuscitation of experimental hemorrhagic shock: a prospective, randomized, controlled study. *Crit Care Med* 1994; 22: 680-9.
  33. Lowe K. Perfluorinated blood substitutes and artificial oxygen carriers. *Blood reviews* 1999; 13: 171-84.
  34. Faithfull N, Weers J. Perfluorocarbon compounds. *Vox Sang* 1998; 74(Suppl. 2): 243-8.
  35. Peerless S, Ishikawa R, Hunter I, Peerless M. Protective effect of Fluosol-DA in acute cerebral ischemia. *Stroke* 1981; 12: 558-63.
  36. Symons J, Sun X, Flaim S, Balzo U. Perflubron emulsion improves tolerance to low-flow ischemia in isolated rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 108-15.
  37. Jaffe C, Wohlgelernter D, Cabin H, Bowman L, Deckelbaum L, Remetz M, Cleman M. Preservation of left ventricular ejection fraction during percutaneous transluminal coronary angioplasty by distal transcatheter coronary perfusion of oxygenated Fluosol DA 20%. *Am Heart J* 1988; 115: 1156-64.
  38. Ogilby J. Cardiovascular applications of fluorocarbons: current status and future direction--a critical clinical appraisal. *Artif Cells Blood Substit Immobil* 1994; 22: 1083-96.
  39. Wall T, Califf R, Blankenship J, Talley J, Tannenbaum M, Schwaiger M, Gacioch G, Cohen M, Sanz M, Leimberger J. Intravenous Fluosol in the treatment of acute myocardial infarction. Results of the Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction 9 Trial. TAMI 9 Research Group. *Circulation* 1994; 90: 114-20.
  40. Mosca R, Rohs T, Waterford R, Childs K, Brunsting L, Bolling S.

- Perfluorocarbon supplementation and postischemic cardiac function. *Surgery* 1996; 120: 197-204.
41. Hale S, Hammerman H, Kloner R. Effects of two perfluorocarbon emulsions on reperfusion injury after coronary artery occlusion in rabbits. *Basic Res Cardiol* 1995; 90: 404-9.
  42. Thoelen M, Rasbach D, Shaw J, Raynolds S, Timmermans P. Preservation of regional and global left ventricular function by intracoronary infusion with oxygenated fluorocarbon emulsion Therox in dogs. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1993; 21: 53-62.
  43. Briceno J, Rincon I, Velez J, Castro I, Arcos M, Velasquez C. Oxygen transport and consumption during experimental cardiopulmonary bypass using Oxyfluor. *ASAIO J* 1999; 45: 322-7.
  44. Rockwell S, Irvin C, Kelly M, Hughes C, Yabuki H, Porter E, Fischer J. Effects of hyperbaric oxygen and a perfluorooctylbromide emulsion on the radiation responses of tumors and normal tissues in rodents. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 22: 87-93.
  45. Rockwell S, Kelly M, Irvin C. Effects of the perfluorochemical emulsion FMIQ on the radiation response of EMT6 tumours. *Int J Radiat Biol* 1992; 61: 833-9.
  46. Teicher B. Combination of perfluorochemical emulsions and carbogen breathing with cancer chemotherapy. *Artif Cells Blood Substit Immobil* 1994; 22: 1109-20.
  47. Teicher B, Herman T, Jones S. Optimization of perfluorochemical levels with radiation therapy in mice. *Cancer Research* 1989; 49: 2693-7.
  48. 伊藤要子, 神取祥和, 高橋昌哉. <sup>19</sup>F-MR imagingによる腫瘍の画像化. *日本医放射学誌* 1995; 55: 345-7.
  49. Sanchez V, Zarif L, Greiner J, Riess J, Cipollini S, Bruneton J. Novel injectable fluorinated contrast agents with enhanced radiopacity. *Artif Cells Blood Substit Immobil* 1994; 22: 1421-8.
  50. Hochachka P, Mommsen T. Protons and anaerobiosis. *Science* 1983; 219: 1391-402.
  51. Hori S, Havaux X, Rubay R, Latinne D, Bazin H, Gianello P. Effect of graft preservation and IgM depletion on guinea pig to rat cardiac xenograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 1554-61.
  52. Voiglio E, Zarif L, Gorry F, Krafft M, Margonari J, Martin X, Riess J, Dubermard J. Aerobic preservation of organs using a new perflubron/lecithin emulsion stabilized by molecular dowels. *J Surg Res* 1996; 63: 439-46.
  53. Kuroda Y, Sakai T, Suzuki Y, Tanioka Y, Matsumoto S, Kim Y, Fujita H, Hamano M, Hasegawa Y, Ku Y, Saitoh Y. Small bowel preservation using a cavitary two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1996; 61: 370-3.
  54. Okada K, Wada S, Kajihara H, Sueda T, Matsuura Y. Beneficial effects of perfluorotributylamine/pluronic F-68 stem-emulsion (FC43se) on discordant lung xenografts. *Hiroshima J Med Sci* 1997; 46: 115-23.
  55. Tanaka M, Tamaki T, Konoeda Y, Kawamura A, Takahashi Y, Ishikura H, Yoshiki T. Impaired recoloration of a discordant liver xenograft in the guinea pig-to-rat combination: physiological insults or immunological responses. *Transplantation* 1999; 68: 304-7.
  56. Spiess B, McCarthy R, Tuman K, Woronowicz A, Tool K, Ivankovich A. Treatment of decompression sickness with a perfluorocarbon emulsion (FD-43). *Undersea Biomed Res* 1988; 15: 31-7.
  57. Menasche P, Pinard E, Desroches A, Seylaz J, Laget P, Geyer R, Piwnica A. Fluorocarbons: a potential treatment of cerebral air embolism in open-heart surgery. *Ann Thorac Surg* 1992; 54: 392-3.
  58. Doronina N, Kurmacheva O, Afonin N. Effects of perfluorochemical emulsion on lipoproteins of plasma blood. *Artif Cells Blood Substitut Immobiliz Biotechnol* 1994; 22: 1295-8.
  59. Tereshina E, Afonin N. Effect of lipid absorption by perfluorochemical emulsions in the bloodstream and perspectives of its clinical application. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 1337-42.
  60. Sekiguchi S, Nakai K. Near-term outlook for the blood service with blood substitutes in Japan. In: Tsuchida E. ed. *Artificial Red Cells*. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1995; 259-75.

## 連載・論文紹介

# 「Perflubron乳剤投与で整形手術における輸血投与を遅延させることができる」論文に対する論評

## Comments on “Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery”

慶應義塾大学医学部救急部 青木 克憲

### 要約

Spahn DRを代表とするヨーロッパPerflubron研究グループのAnesthesiology発表論文についてコメントした。人工酸素運搬体の酸素運搬能に関する評価に関して、肺動脈カテーテルによる全身の酸素運搬量に、組織酸素代謝のモリタリングを追加すべきこと、副作用の血圧上昇、血小板低下、免疫能の低下に関する詳細な検討が必要なこと、肺酸素化能の低下している多発外傷患者において、100%酸素吸入という投与上の制約が適応基準を満たさなくなる可能性などを述べた。しかし、人工酸素運搬体は、微小循環蘇生に対する残された治療薬として、救急医学を含む重症治療管理学の分野で大きな期待が掛けられていることを強調した。

### Abstract

We made comments on the first prospective randomized clinical study of a second-generation perfluolocarbon emulsion, Perflubron, conducted with a large multicentered protocol of the complexity. 1. Adequacy of regional perfusion should be assessed by evaluating indices of organ function, for example, the splanchnic circulation by employing gastric tonometry, in addition with global perfusion by pulmonary artery catheter. 2. Further analyses need to be done for the known adverse effects on platelets, a flu-like syndrome, and the immune system. 3. It may be likely that the requirement for high inspired oxygen limits the oxygen carrying-capacity of Perflubron in multiple-trauma patients frequently associated with reduced pulmonary oxygenation. Artificial blood substitutes, however, will make a contribution to the resuscitation of micro-circulation as well as a temporary red cell substitute in acute disease in the future.

はじめに、外傷外科の立場から、人工酸素運搬体の必要性について述べ、次に表題の治験論文についての疑問点を述べる。

Murrayら<sup>1)</sup>によると、1990年の地球上の死者数5億人の死因のうち、外傷によるものが約5000万人（10%）と推計されている。先進国と開発途上国では、内因性疾患の構成に差が見られるが、外傷死は、地域差を認めず、地球上では10人のうち1人が外傷で死亡していることになる。外傷死は、社会的に最も生産的な年齢層の死因の第1位であり、社会的システムを含め健康政策上大きな問題である。

外傷死の発生は、3つの時間帯に分かれる。約50%の外傷死は、受傷直後、脳損傷あるいは出血により、現場で即死状態となる。次に、約30%の死亡は、第2の時間帯、すなわち、受傷直後の数時間

に発生し、医師の関与し得る救命可能な対象となる。一部は、不適切治療による preventable death、すなわち、防ぎ得た死が含まれるといわれる。残りの20%は、受傷後、数週から数ヶ月後、感染や多臓器不全が死因となる。以上より、初期治療の最大の課題は、第2の時間帯において死亡しやすいショック患者を救うことにある。初期治療のポイントは、呼吸・循環・中枢神経をつなぐ酸素の流れを確保することにある。

人工酸素運搬体が必要と想定される救急疾患は、出血性ショックを伴う多発外傷である。多発外傷とは、頭部、胸部、腹部、四肢などの身体各部分の複数部位に生命脅威的な損傷が及んだ状態であり、出血性ショックが中心となるが、その他に、低酸素血症、心原性（心肺損傷）

および神経性ショック（脊損など）、脳の直接損傷などを合併して、病態が複雑になることが多い。救命の鍵を握る時間帯は、病院到着から、全身状態の把握、傷病部位の診断、緊急手術の決断までの約1時間、さらに、手術室の準備、麻酔科医の対応、輸血の準備、手術室への搬送などを加えて合計約2時間であり、この間の生体内組織酸素代謝の維持が至上命題となる。前述の通り、多発外傷の病態は必ずしも出血性ショックだけに限られないが、preventable deathの研究から、救命は、輸血投与量ではなく、輸血の開始時間に規定されるといわれている。本邦は、米国のように、O型・Rh(-)血液製剤は輸血部に用意されていない。患者の血型判定および輸血製剤のクロスマッチまでには最低30分かかる。したがって、

その場で人工酸素運搬体が利用できれば、ショックにおける血流再配分の弊害を短時間に抑え込むことが可能となり、単に救命だけではなく、蘇生後のQOLの改善にも寄与する可能性がある。救急医療の現場における人工酸素運搬体にかかる期待は非常に高い。

第2世代Perflubron乳剤に関する本論文<sup>2)</sup>は、対象を限定して整形外科手術患者に絞り、急性血液希釈状態 (Acute Normovolemic Hemodilution, 以下ANH) における酸素運搬の維持に人工酸素運搬体が寄与できるかという明確な目的を掲げてプロトコールが設定された。本論文は、欧洲6カ国11機関にて約1年間にわたって行われた共同研究であり、輸血要因などのきめ細かなプロトコールにかかわらず、147人の患者に実施されたことは驚嘆に値する。無作為的に選ばれた4群の患者構成、手術時間、回収された出血量、ANH後の酸素代謝指標値は有意差無く均等に分かれている。われわれは、このような報告から共同研究のあり方を真摯に学ばなければならぬと思う。人工酸素運搬体の治験計画は、本論文にあるように、酸素運搬能の実証という地道な視点から進めて行くべきであることも納得される。しかし、安全域の広い条件での治療であるため、negative studyと指摘される可能性もある<sup>3)</sup>。本邦においても、ANHと関連した術中の投与、あるいは不規則抗体保有者の輸血副作用回避などの治験プロトコールとして本論文は良い雑形になると考えられる。

本論文についてのコメントを、救急の現場からの意見として、以下に述べる。

## 1. 全身酸素代謝のモニタリングだけで良いか？

本研究は、肺動脈カテーテルによる全身酸素代謝指標の変動を比較している。投与前後で有意差の出た項目は、PCWPが、P0.9群で増加（正常範囲内）、MPAPが、P0.9群およびAB群で増加（正常範囲内）、CI、Do<sub>2</sub>が、COL群を除く3群で増加（正常範囲内）、Pvo<sub>2</sub>、Svo<sub>2</sub>、Cvo<sub>2</sub>が全群で増加、Cao<sub>2</sub>がP0.9群、P1.8群で増加、O<sub>2</sub>EXが、全群で低下（正常範囲内）という結果であった。Perflubron投与によりDo<sub>2</sub>が増加した一方、肺循環に与える影響は僅少であった。Pvo<sub>2</sub>が第2の輸血要因になるまでの時間はP1.8群で最も長く、これは、100%酸素吸入によりHb中の酸素含量と溶解酸素量が同等になったことの影響が考えられる。また、Do<sub>2</sub>およびV<sub>O</sub><sub>2</sub>は心臓を起点とした血液酸素含量の収支決算を示すものであり、実際に各組織で酸素運搬と利用が十分に行われたのかについての直接の立証にはならない。ミクロの組織酸素代謝動態については、optical spectroscopyの進歩により多くの実験報告が集積されているが、臨床のベッドサイドにおける組織低酸素症のリアルタイム・モニタリングは、現時点で消化管トノメーターしかない。もし、消化管粘膜のPco<sub>2</sub>値が60Torr以上を示す場合は、血流不均等配分か、組織での酸素拡散障害が予測される。われわれは、外傷性ショック19例を対象に胃粘膜Pco<sub>2</sub>値を測定した結果、組織低酸素症の遷延と多臓器不全の間に有意の関連を認めた<sup>4)</sup>。今後、肺動脈カテーテルによる全身酸素代謝指標と消化管トノメーターによる組織酸素代謝指標の両者のモニタリングが必要と思われる。

影響は僅少であった。Pvo<sub>2</sub>が第2の輸血要因になるまでの時間はP1.8群で最も長く、これは、100%酸素吸入によりHb中の酸素含量と溶解酸素量が同等になったことの影響が考えられる。また、Do<sub>2</sub>およびV<sub>O</sub><sub>2</sub>は心臓を起点とした血液酸素含量の収支決算を示すものであり、実際に各組織で酸素運搬と利用が十分に行われたのかについての直接の立証にはならない。ミクロの組織酸素代謝動態については、optical spectroscopyの進歩により多くの実験報告が集積されているが、臨床のベッドサイドにおける組織低酸素症のリアルタイム・モニタリングは、現時点で消化管トノメーターしかない。もし、消化管粘膜のPco<sub>2</sub>値が60Torr以上を示す場合は、血流不均等配分か、組織での酸素拡散障害が予測される。われわれは、外傷性ショック19例を対象に胃粘膜Pco<sub>2</sub>値を測定した結果、組織低酸素症の遷延と多臓器不全の間に有意の関連を認めた<sup>4)</sup>。今後、肺動脈カテーテルによる全身酸素代謝指標と消化管トノメーターによる組織酸素代謝指標の両者のモニタリングが必要と思われる。

## 2. Perflubron投与の安全性について

P1.8群では、投与後に血圧上昇を認めている。また、具体的な数字は記述されていないが、血小板数の低下が報告された。しかし、文献的に知られている他の副作用、インフルエンザ様の症状、網内系の機能低下等は記述されていない。外傷患者を対象とした場合、低体温、アシドーシス、凝固能の低下は予後不良の徵候 (deadly triad) である。Perflubron投与による血小板数の低下は、術後出血など止血機構にどの程度の影響をもたらすのか危惧される。また、低体温予防のために、病院到着から加温輸液 (40°C) を開始するが、Perflubronへの影響はないか？また、第1世代のFluosol DAが本邦で不認可となった根拠の副作用については、今回、長期的な観点で確認されたのであろうか？

## 3. 人工酸素運搬体投与の適応選定について

近年、同種血輸血回避の目的で術前の自己血貯血あるいは術中の血液希釈が行

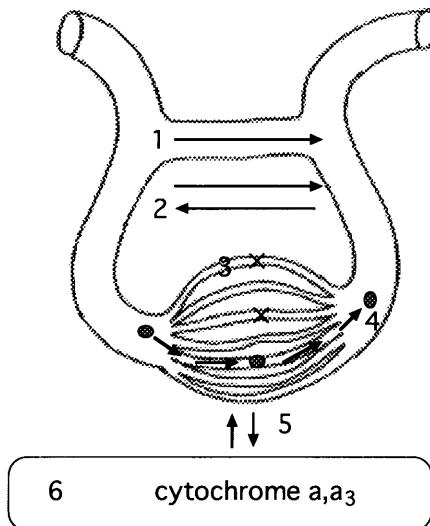
われており、心臓大血管手術の待機手術ではほぼ日常化されている。本報告では術前貯血の煩雑さと経費高に対する代替措置としてのPerflubron利用が唱えられているが、訳者のコメント<sup>5)</sup>にもあるように、この意義に関しては、今後さらに検討されるべきである。自己血確保の手間は確かに大変であるが、同種血輸血による感染、術後合併症、入院期間、生存期間等を勘案すると、今後ますます自己血輸血の方向に進むと考えられる<sup>6)</sup>。

## 4. 100%酸素吸入の条件

Perflubronの酸素運搬能は、100%酸素吸入条件下での円滑なガス交換が保証されないと機能しない。ショックを呈する多発外傷患者では、ほとんど例外無く、肺における酸素化能の低下が観察される。すなわち、100%酸素を吸入させても、動脈血酸素分压は、本論文の整形外科待機患者のように400Torrに増加することは考えられない。同様に、Perflubronは、inertな形で網内系から肝に蓄積され肺から排泄されるが、この代謝過程が外傷患者においても保証されるか、危惧される。

出血性ショックあるいはセプティックショックのいずれにおいても、微小循環不全の進行により組織での酸素負債が発生すると考えられる。微小循環不全のメカニズムは、シャント血流の増加、counter-current systemの増強、血栓形成等による毛細血管密度の低下、赤血球の酸素遊離の低下、組織間質の浮腫による酸素拡散の低下、細胞の酸素利用能の低下等の要因が考えられる（図1）。

セプシスにおける微小循環不全の蘇生に関して多くの試みがなされている。DO<sub>2</sub> supranormalization (1988年、Shoemakerら<sup>7)</sup>) は、cardiac index>4.5L/min.m<sup>2</sup>、DO<sub>2</sub>>600 ml/min.m<sup>2</sup>、VO<sub>2</sub>>170 ml/min.m<sup>2</sup>を目標とする治療戦略で、近年これに否定的な報告が提出されている。次に、dobutamine, dopexamineなどの血管拡張薬を併用して、臓器間、あるいは臓器内の不均等な血流分布の調整が報告されているが、その効果は明らかではない。組織灌流圧の上昇を目的とした昇圧剤の投与は、シャント血流を増加させる懸念がある。次に、新鮮血による赤血球変形能の確保は、血液粘度の低下、毛細管血流の



1. シャント血流の増加
2. counter-current systemの増強
3. 毛細管密度の低下
4. 赤血球の酸素遊離低下
5. 組織間質の浮腫による酸素拡散の低下
6. 細胞の酸素利用能の低下

図1. 組織酸素代謝失調の病態

改善 (shear stressの低下), 酸素拡散の改善が得られるが, この方法にも限界がある。メディエーター活性の抑制およびサイトカイン・モジュレーションも考えられているが, 成功していない。間質における酸素拡散の改善策として, 血管新生因子の投与や, 血液浄化法による組織浮腫の是正が報告されている。しかし, 細胞膜に達した酸素が, ミトコンドリアに到達するまでの細胞内酸素運搬障害の対策は未解決である。残された治療策として, 人工酸素運搬体の投与があげられる。人工酸素運搬体は, 酸素運搬効率が赤血球に比較し高いこと, 粒子径が小さく, かつ低粘度により, 赤血球が進入不能な微小循環への酸素運搬が可能であることなどの特質により, 組織酸素代謝障害の残された治療策として有力である。集中治療の現場で死因の第1位になっている敗血症性多臓器不全の治療成績の向上をもたらす可能性がある。今後, 救急医学を含む重症治療管理学の分野で, 人工酸素運搬体は最も期待される治療手段のひとつである。

#### 文献

1. Murray CJL, Lopez AD. Global Health Statistics. 1996
2. Spahn DR, van Brempt R, Theilmeier G, et al. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. *Anesthesiology* 91:1195-1208, 1999
3. Tremper KT. Perfluorochemical "blood substitutes". *Anesthesiology* 91:1185-1187, 1999
4. 青木克憲, 吉野篤人, 土井松幸, 他. 外傷性ショック後の消化管虚血と Bacterial Translocationの可能性. *ICU* と *CCU* 23: 291-298, 1999
5. 土田英俊, 酒井宏水. Perflubron 乳剤投与で整形手術時の輸血を遅延させることができる. *人工血液* 8: 21-25, 2000
6. Hebert PC, Weis G, Blajchman MA, et al. A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. *N Engl J Med* 340:409-417, 1999
7. Shoemaker WC, Appel PL, Kram HB, et al. Prospective trial of supranormal values of survivors as therapeutic goals in high risk surgical patients. *Chest* 94:1176-86, 1988

## 海外文献紹介

Art Cells Blood Subs Immob Biotech 27(1):23-41,1999

### リポソーム内包型ヘモグロビンによる補体を介した急性反応 (Complement-mediated acute effects of liposome-encapsulated hemoglobin)

Szebeni J, Alving CR

Walter Reed Army Institute of Research, Washington, DC

北海道赤十字血液センター 池淵研二・池田久實

#### 訳者からのコメント

リポソーム内包型ヘモグロビン (LEH) は、分子修飾ヘモグロビンと並んで活発に開発研究が行われている。現在までに臨床試験に至っている分子内架橋型ヘモグロビン、ポリマー化ヘモグロビンなど数種類の分子修飾型ヘモグロビンとは異なり、LEHはヘモグロビンが直接血液に触れない、血管内皮細胞や肝臓類洞血管内皮細胞の間隙を通過せず血管作動性を示さない、血管内滞留時間が長い、ヘモグロビン以外の物質も内包させることができる、など種々のメリットがある製剤として認められている。われわれの施設でもLEHが実際に投与される時を想定し、製剤の生体適合性を調査している。リポソームの表面を加工し、ステルス化が図られているが、これまで調べたin vitro系では網内系細胞に認識され、容易に貪食される。さらにステルス化を図るための条件を探っているが、そうした方向性の中でリポソーム表面と補体に関する興味深い論文に出会ったので、紹介したい。(なお、訳した文中の四角囲みの部分は、訳者が本文の要点を整理するために勝手に設けたものであることを、初めにお断りいたします。)

#### 抄録

リポソーム内包型ヘモグロビン (LEH) はラット、ブタ、ヒトの補体系を活性化しうる。これには古典的経路および別経路の両者が関わっている。リポソームの

脂質膜に対する抗脂質自然抗体が結合することが反応の契機となるようだ。これまでLEHやリポソームを投与されたラット、ブタの実験系で、急性の生理学的、血液学的、検査学的变化が誘導され、心拍出量の低下を伴う肺の血管収縮などが惹起されるが、その主な原因は補体の活性化と考えられる。LEHを赤血球代替物として用いる場合、外傷患者などはすでに外傷によって補体が活性化され、呼吸不全準備状態に陥っているため、LEH投与がさらに惹起する心臓呼吸器系機能の障害については十分検討されなければならない。我々のラットとブタを用いた検討では、これらLEH投与に合併する心臓呼吸器系不全を含めた副作用は、補体活性化の特異的インヒビターである可溶性補体受容体タイプIの投与によって効果的に抑制されることが示された。

#### はじめに

クロスリンクヘモグロビンや分子修飾型ヘモグロビンは血管収縮作用を有し、動脈圧を上昇させ消化管障害を惹起するので、それを乗り越えるためにLEHの開発が進められている。血管収縮はヘモグロビンが誘導する血管内皮細胞、血管内皮下平滑筋細胞機能の変化に由来し、血管弛緩作用を有するNOの機能を阻害することによると考えられる。

リポソームに内包させるとヘモグロビンは遊離せず、フリーのヘモグロビンと血管内皮細胞との相互作用は防止でき

る。LEHは血管内皮下空隙には移行できない。多くの動物実験でもLEH投与は長時間の全身血圧上昇や腎臓、消化管障害を惹起しない。

しかしLEHは完全に心臓血管障害を起こさないとは言い切れず、補体の活性化に伴う別のタイプの障害を惹起することが分かった。この補体の活性化はヘモグロビンによるものではなく、LEHにリン脂質とコレステロールが含まれていることに関連している。緊急時の赤血球代替物としてLEHを用いる場合、この免疫系によって惹起される心臓呼吸器系副作用を十分理解しておくことが重要であろう。

#### LEHやリポソームを投与された動物に生じる急性の生理学的、検査学的变化

多くの動物実験では出血させた時の蘇生薬としてLEHの効果が検討されてきた。それらのうち一過性の心臓血管、血液学的、および生化学的变化がラット、ブタで惹起されることが報告された。イヌ、ウサギ、サルでは惹起されない。

LEH投与で急性変化が惹起される動物種
ラット、ブタ
起こさない動物種
イヌ、ウサギ、サル

ラット、ブタで生じる急性の副作用はリポソーム投与直後から起り20~120分

### 急性症状：過換気

低血圧あるいは血圧上昇  
徐脈あるいは頻脈  
心拍出量減少  
血液濃縮  
血小板減少  
白血球増加  
血中トロンボキサンB2高値

もLEHやリポソームが起こす急性反応に種差があることと符号する。

### 血管作動性炎症性

メディエーター：ヒスタミン  
トロンボキサンA2  
プロスタグランジン  
ロイコトリエン  
PAF

コレステロール (Chol)

αトコフェロール  
(50 : 4.5 : 45 : 0.5モル%)

・大型多重膜リポソーム  
(粒径分布は0.2~2μmと広い)

#### 構成成分

ジミリストイルフォスファチジルコリン (DMPC)  
DMPG  
Chol (50 : 5 : 45モル%)

後に消失する。

ラットでこれらの副作用が生じるにはかなり大量のLEHあるいはリポソームが投与される必要がある（例えば体重1kg当たり200-600ミリモルのリン脂質が循環血液量の10%くらいの量で投与される）。一方ブタではこの10分の1量の投与でも一部の動物は死亡するし、最も少ない場合では体重1kg当たり0.1ミリモルのリン脂質を1ml量で投与した場合にも反応が惹起される。以上のことから、リポソームが惹起する急性反応には動物種差があることが分かった。

### LEHおよびリポソームが惹起する副作用の機序

いくつかの仮説が提出されている。リポソームのアラキドン酸、コレステロール、リゾレシチン（大豆レシチンを用いたリポソームの場合）による心臓直接作用、白血球や血小板からの血小板活性化因子（PAF）とトロンボキサンA2の放出、などの機序が想定された。

リポソームが補体系を活性化することは過去に報告があり、リポソームにより惹起される急性反応のタイムコースとその種類が、補体の活性化による変化と類似していることから、補体の活性化がLEH投与時の生理学的変化を説明しうるものと予想した。アレルゲンが肥満細胞や好塩基球の細胞表面のIgEに結合するのと同様に、アナフィラトキシンであるC3aとC5aがこれらの細胞の脱顆粒を起こし、血管作動性炎症性メディエーターを放出させる。結果として、ラットやブタでLEHやリポソーム投与時に認められる急性反応に極めて類似した反応を惹起する。またアナフィラトキシンが示す血管作動性、収縮作用には種差があり、これ

### in vivoおよびin vitro系におけるLEH、リポソームが惹起する補体活性化

ラットで急性反応を起こしたLEHとリポソームを用いて、in vivoおよびin vitroでラットの溶血補体活性を測定したところ、有意な減少が認められた。これは補体の消費があったことを意味する。ヒト血清を用いたin vitro系でも再現した。ヘモグロビンフリーリポソーム（空リポソーム）を用いても、LEHと同様のCH50の低下が認められたので、補体の消費はリポソームそのものにより惹起されることが明らかになった。LEHとリポソームで若干の差が認められたが、これは同じ脂質を用いているので、内部のヘモグロビンとネガティブに帯電した脂質2重膜の相互作用が生じ、一部ヘモグロビンがリポソーム表面に発現してくることが関係している可能性が考えられた。

LEHやリポソームと血清を反応させると、C5a依存性の凝集、ヒトおよびブタ白血球の遊走能亢進が惹起される。ブタ血清に曝されたリポソームから補体依存性にグルコースが放出される（訳者注：グルコースを内包したリポソームを作成し、リポソーム膜が傷害されるとグルコースが漏出することを見る系であろう）現象は、リポソーム膜にC5b-9複合体が形成されていることを証拠づける。

これまでリポソームが補体系を活性化することを報告した文献は多く、抗原性を有するリポソーム、ハプテンタンパクや脂質を有した免疫リポソームを扱ったもの、電荷を有するフォスフォリピドを20%程度まで高濃度に含んだリポソームを扱ったものが殆どであり、今回のように非免疫性のリポソームが補体系を活性化するという知見は新規の情報と考えられる。

### LEHが惹起する補体活性化が生理学的变化の原因であることの証明

LEHを投与されたラットの血中CH50の減少とトロンボキサンB2の増加は強く相関して起こる。LEHで惹起されるトロンボキサンB2の増加がラットの血小板減少やその他の急性反応と強く相関することを考えると、補体活性化とLEHによる急性生理学的変化は原因と結果の関係にあることが予想される。

#### 補体説の証拠

- 1) ラットの系で可溶性補体受容体1(sCR1)がLEH惹起性の血漿トロンボキサンB2レベルの上昇を抑制する
- 2) ラットでコブラ毒因子を用い補体を除去するとLEHによる血小板減少症が回避できる
- 3) ブタの系でsCR1投与でリポソーム惹起性肺動脈圧上昇やその他的心臓血管症状が完全に抑制できる

### 検討に用いたリポソームおよびLEH：

・大型一枚膜リポソーム  
(粒径は均一で直径は $0.3 \pm 0.1\mu\text{m}$ )

#### 構成成分

ジステアロイルフォスファチジルコリン (DSPC)  
ジミリストイルフォスファチジルグリセロール (DMPG)

## LEHおよびリポソームが惹起する補体活性化の機序

機序を考える際には反応に種差があることを考慮に入れた。古典的補体活性化を抑制するEGTA/Mg<sup>++</sup>はラット血清を用いた系でLEHによる補体消費を抑制ではなく亢進させる。これは別経路が活性化されたことを意味する。逆にEGTA/Mg<sup>++</sup>はヒト血清を用いた系ではリポソームによる補体の活性化を部分的に抑制する。これは古典的および別経路の両者を活性化することを示す。

最も良く知られた古典的補体活性化機序は、補体アクティベーターであるIgMおよびIgG抗体が、表面に結合した抗原に反応することである。そのためリポソーム惹起性の補体活性化にも自然抗体の役割を想定した。

### 自然抗体の存在証明

- 1) ラット、ヒト、ブタの血清は比較的高力価のリポソーム反応性IgMを含有し、やや低力価ではあるがIgGを含有している。
- 2) ブタ血清中のリポソームにこれらの抗体は結合する。
- 3) ヒト血清中でIgMがLEHに結合する率は、LEHの補体消費効果とよく相関するがIgGにはこれは認められない。

古典的補体活性化に加え、抗体のF(ab)部分がC3bに結合することを介して補体の別経路を活性化できる。

補体の活性化機序は動物種、リポソームの生理学的および化学的性質、抗リポソーム抗体の存在とその量、によって異なる。そのため同じ種でも反応は異なりうる。LEHが惹起するSC5b-9の産生を10人の正常者を対象に測定した成績でも個人差が大きいもその現れである。

### 補体の活性化

- 動物種差
- 個人差

## 補体活性化と生理学的变化が連動する機序

LEHやリポソームが惹起する生理学的变化の原因が補体の活性化にあるとすると、ある動物種においては感染症、ある種の外傷、血液凝固、体外循環（血液透析、心肺バイパスなど）に続発して劇的で致死的な心臓血管反応やその他の反応を起こすのに、別の動物種では何も起こさないという、この解離現象を説明できることが必要になる。初めにアナフィラトキシンシグナルが血管あるいは気管支平滑筋細胞へ伝えられる際の増幅経路の効率の違いに原因が求められるかも知れない。補体の活性化と同じく、この増幅経路も種特異的な細胞および分子相互作用が係わっているのであろう。アナフィラトキシンは肥満細胞、好塩基球、マクロファージに働き、トロンボキサンA2やヒスタミンを含む他のアゴニストとアンタゴニスト作用物質を放出させる。このトロンボキサンA2はリポソームに対して肺が反応する際の主要な2次メディエーターである。C5aが好中球に結合すると細胞表面のPAFの発現が増強し、血小板が付着しさらにトロンボキサンA2の放出が続く。C5aは血管内皮細胞へも結合しNOの産生を抑制するため、トロンボキサンA2による血管収縮が増強される。

補体活性化の最終活性産物であるC5b-9は血小板、血管内皮細胞、赤血球（バイスタンダー的な）に沈着し、細胞膜を傷害し機能を修飾する。C5aが示す反応ほど急性のものではないが、これらの反応は血小板のトロンボキサンA2に対する過剰反応、活性化血管内皮細胞からのエンドセリン放出、傷害された赤血球からの血管作動性ヘモグロビンの放出などの経路を介して心臓血管の異常に役割を演じる。

### 急性反応のメディエーター

- トロンボキサンA2
- ヒスタミン
- NO
- エンドセリン
- ヘモグロビン

## LEHによる補体活性化と臨床面での重要性

LEHの利用目的の1つは、外傷患者に対し出血量を補うことであるが、彼らは外傷に続発した補体の活性化により既に呼吸窮迫症候群に陥り易い状態になっている。LEHがヒトの血漿で補体の活性化を惹起できるという今回のデータに基づくと、この製剤が血液代替物として安全かどうか、新たに考える必要が出てきた。すなわち、大量のLEH投与は外傷患者の臨床病態を悪化させる可能性があるかも知れない。

他のリポソーム製剤を用いた臨床試験第I相、第II相試験が実施されているが、その中でリポソームが急性毒性の原因と考えられる臨床報告がある。リポソーム型アンフォテリシンB (AmBisome) が投与された癌患者の1人が肺動脈圧上昇、心拍出量低下、頻脈、低酸素血症、代謝性アシドーシスに陥った。別の症例報告ではAmBisomeを投与された患者の2人が重篤な低血圧とチアノーゼに陥った。報告者らはこれらの反応は生命予後を左右するため、初めて治療で投与する場合は救急蘇生が迅速に実施できる病院で、医師の厳重な監視の元に実施されることを提倡している。AmBisome製剤による軽度から重篤な副作用の頻度は2%から7%と推定される。リポソーム型ドキソルビシン (Doxil) の投与試験では56例中5例に副作用が現れ、別の臨床試験ではDoxilに対する過敏反応が9%の例に認められた。このように、リポソーム製剤に対する反応（偽アレルギーと呼ばれる）は、種々の薬剤に対し古典的なI型アレルギー (IgEを介する) が起こる頻度より高頻度で生じると言える。重要な点は、もし健常者に7-9%の頻度でリポソーム製剤が心臓呼吸窮迫状態を含むアレルギー様反応を生じる可能性があるとすると、外傷患者の場合は同じくより高頻度に心肺に対する副作用が生じる可能性があり、これが患者の臨床病態を増悪させる可能性があることである。LEHを緊急の赤血球代替物をして使用するには、リポソームが惹起する補体活性化を抑制することが非常に重要であると言える。

リポソーム製剤の臨床試験と急性毒性  
リポソーム型アンフォテリシンB  
(AmBisome)  
リポソーム型ドキソルビシン(Doxil)

### 可溶性補体受容体タイプIを用いたリポソーム惹起性補体活性化の抑制

リコンビナント、トランケート型の可溶性補体受容体タイプI(sCR1)が用いられる可能性がある。この210–230kDaの膜タンパクは赤血球、白血球、その他いくつかの血球以外の細胞の表面に存在し、補体の活性化を次のような機序で抑制する。

#### 補体活性化の抑制機序

- 1) C3およびC5転換酵素の崩壊を促進する
- 2) factor IによるC3bとC4bのタンパク分解の補酵素として働く

sCR1にはこの両方の作用があることが証明され、補体を介した組織傷害を含めた種々の病態で利用できるかどうか検討されている。

in vitro系でヒト血漿中のLEH惹起性補体活性化は0.16–20μg/mlの範囲で抑制される。in vivo系でブタのリポソームによる心肺反応は0.2–2mg/kgの投与範囲で抑制される。この濃度は薬剤が効果的な治療薬として用いられる際の有効濃度の範囲内、あるいはより低濃度であるため、LEHによる副作用を抑制するために用いる治療薬としてベネフィットがあると想定されている。

#### 参考文献

Szebeni J, Wassef NM, Hartman KR, Rudolph AS, Alving CR: Complement activation in vitro by the red cell substitute, liposome-encapsulated hemoglobin: mechanism of activation and inhibition by soluble complement receptor type 1. *Transfusion* 37:150–159, 1997

#### 読者からのコメント

著者のAlvingはこの領域の仕事を継続して行っている。リポソームのステルス化が補体の活性化をどの程度抑制できるのか、彼らの系で確かめた成績を示してほしいものだ。

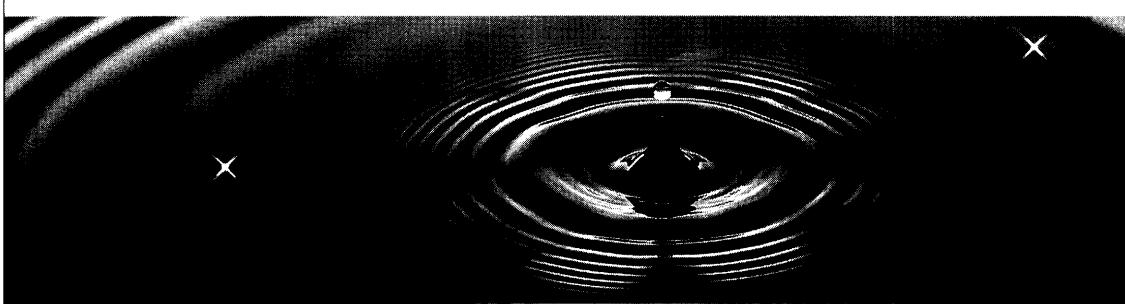
## 静注用人免疫グロブリン製剤

薬価基準収載

指定医薬品

# 献血グロベニン®-I-ニチヤク

〈乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン〉



■ 効能・効果、用法・用量、使用上の注意(禁忌)等については、添付文書をご参照ください。

製造〔資料請求先〕

▲日本製薬株式会社  
〒101-0031 東京都千代田区東神田一丁目9番8号

販売

▲武田薬品工業株式会社  
〒540-8645 大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1999年5月作成(K)

## ●編集後記●

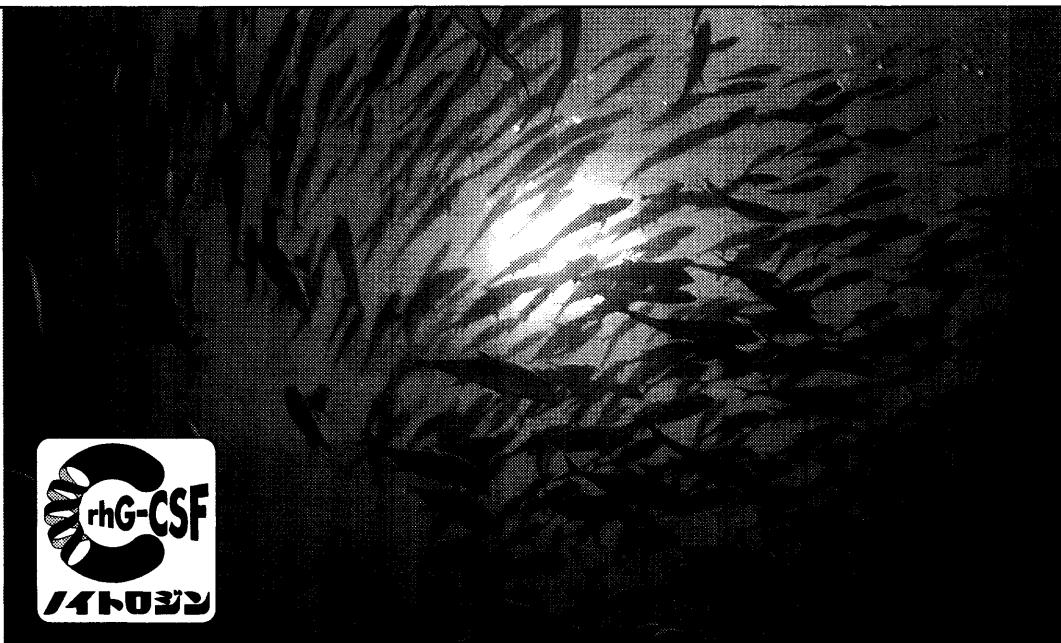
編集委員長の宮尾です。副委員長の渡辺先生に編集の仕事をお任せして、4月から米国ピツバーグ大学に6ヶ月間の単身留学中です。ピツバーグはニューヨークの西部約300マイルに位置し、昔は鉄鋼の町として有名でしたが、今はその面影しかなく、経済都市、学園都市として成り立っています。ピツバーグ大学医学部附属病院はずいぶん昔にポリオワクチンを開発したのが有名で、最近は肝臓移植で有名で症例は全米一を誇っています。

アメリカの医療保険制度の破綻が最近クローズアップされています。定額制導入により、医療そのものより経済性が優先され医療が荒廃しています。冠動脈再建術を受けた患者は医者も患者も不安を抱きながら術後3日で退院させられます。薬剤の投与も保険会社に許可を得る必要があったりします。病気に対して定額の保険が支払われるために、なるべく安価な処置で、安い薬を使い、早く退院させた方が、保険会社も病院も利益は上

がります。そういう保険制度の弊害をなくすために、ピツバーグ大学は大学独自で保健医療会社を立ち上げています。しかし、日本の制度も問題で、冠動脈手術がスムーズに経過した患者と、術後合併症で大変に苦労した患者の場合、保険から支給される額は合併症患者の方が圧倒的に多くなります。つまり、下手な医療に多くの保険が支払われるという仕組みです。またこちらでは医学部の授業料が高いことも問題になっています。学生は銀行ローンで卒業し、そのお金を返すために卒後早い段階でお金儲けに走り、研究は外国人任せになっているという状況です。日本人をはじめ多くの海外留学生を受け入れている背景にはそういった事情も絡んでいます。

渡辺先生はじめ編集委員の先生方にはご迷惑をお掛けしています。9月末に帰国しますので宜しくお願ひ申しあげます。

(宮尾秀樹)



### 遺伝子組換えヒトG-CSF製剤

指定医薬品・要指示医薬品

薬価基準収載

**イトロジン**<sup>®</sup>  
NEUTROGIN<sup>®</sup> injection 一般名 レノグラスチム(遺伝子組換え)

50 $\mu$ g  
100 $\mu$ g  
250 $\mu$ g



[資料請求先]  
中外製薬株式会社  
〒104-8301 東京都中央区京橋2-1-9

CNU8218

※効能・効果、用法・用量、使用上の注意、取扱い上の注意等は製品添付文書をご参照ください。

# にっぽんの血液製剤です。

献血であることの誇りと重責……



禁忌 (次の患者には投与しないこと)

本剤の成分に対しショックの

既往歴のある患者

原則禁忌 (次の患者には投与しないことを原則とするが、特に必要とする場合には慎重に投与すること)

本剤の成分に対し過敏症の

既往歴のある患者

冷蔵保存から室温保存になりました。

血漿分画製剤

指定医薬品

献血由来 静注用人免疫グロブリン製剤

## 献血ベニロン-I<sup>®</sup>

〈乾燥スルホ化人免疫グロブリン〉

生物学的製剤基準

Kenketsu Venilon<sup>®</sup>-I

薬価基準収載

本剤は、献血による貴重な血液を原料として製剤化されたものです。問診、感染症関連の検査等の安全対策を講じていますが、血液を原料としていることに由来する感染症の伝播等の危険性を完全に排除することはできないことから、疾病の治療上の必要性を十分に検討の上、必要最小限の使用にとどめるようお願いします。(「使用上の注意」の項参照) ●ご使用に際しましては、製品添付文書をご参照下さい。

販売元・販売

TEIJIN 帝人株式会社

医業医療事業本部 〒100-8585 東京都千代田区内幸町2-1-1  
資料請求先: 帝人株式会社医業医療事業本部学術情報部

製造元・販売

化血研 財團法人化学及血清療法研究所  
化血研 財團法人化学及血清療法研究所  
化血研 財團法人化学及血清療法研究所

資料請求先: (財) 化学及血清療法研究所営業管理部

資料請求先: 帝人(株)医業医療事業本部学術情報部

(財) 化学及血清療法研究所営業管理部

VE 16-9908 作成年月 1999年11月

# Bolster & Heal

## ボルヒール<sup>®</sup>

BOLHEAL<sup>®</sup> ■健保適用

●ご使用に際しましては製品添付文書をご参考下さい。

販売

TEIJIN

帝人株式会社

医業医療事業本部 〒100-8585 東京都千代田区内幸町2-1-1

製造元・販売

化血研

熊本市大通1-6-1 〒860-0568

資料請求先: 帝人株式会社医業医療事業本部第2学術部  
化学及血清療法研究所営業部

BO11T9010

作成年月 1998年10月

B52

## 投稿規定

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集める。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

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4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよび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。
- 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<sup>2)</sup>, <sup>3-5)</sup>, <sup>1)</sup>, <sup>4-6)</sup>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。
- 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

●宮尾秀樹(委員長)、池淵研二、武岡真司、友田輝夫、仲井邦彦、西出宏之、堀之内宏久、村田満、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. 8 (2) 2000年7月15日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL (03)5363-3806 FAX (03)5363-3493

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL (03)5363-3806 FAX (03)5363-3493

〒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