

人工血液

第 12 卷 第 1 号 2004 年 6 月

目 次

会告	002
総説	Fluosol-DAの補体活性化に関する回顧的考察津田良夫	006
原著	血小板膜タンパク結合アルブミン重合体による 血流条件下コラーゲン表面における 血小板血栓増強効果田村典子	013
海外文献紹介	冠動脈バイパスグラフト手術患者における 輸血低減のための術中自己血投与補助としての 酸素運搬体の使用山本 学	019

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 12 No. 1 June, 2004

Contents

<i>Announcement</i>	002
<i>Review: Retrospective Discussion on Complement Activation by Fluosol-DA</i>Yoshio Tsuda	006
<i>Original Article :</i>		
<i>Enhancing Effects of Albumin Polymers Bound with Functional Recombinant Fragment of Platelet Specific Membrane Glycoproteins on Platelet Thrombus Formation on the Immobilized Collagen Surface Under Blood Flow Conditions.....Noriko Tamura</i>		013
<i>Topics: Use of an Oxygen Therapeutic as an Adjunct to Intraoperative Autologous Donation to Reduce Transfusion Requirements in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery</i>Manabu Yamamoto	019

第11回日本血液代替物学会年次大会 会告

会 期 平成16年7月13日(火)~14日(水)
会 場 北方圏センター(札幌市中央区北3条西7丁目 道庁別館12階)
大会長 特定医療法人北楡会 札幌北楡病院 川村 明夫

プログラム概要

7月13日(火)

9:00 開会の辞
9:05~11:15 ワークショップ1「酸素運搬体系血液代替物開発の現況」
司会 武岡真司(早稲田大学理工学総合研究センター)
高折益彦(東宝塚さとう病院)

- W1-1 ナノカプセル型人工酸素運搬体の開発現況
緒方嘉貴, 金田伸一
(テルモ株式会社研究開発センター)
- W1-2 L-チロシン内包によるヘモグロビン小胞体のメト化抑制
阿閉友保, 武岡真司, 土田英俊
(早稲田大学理工学総合研究センター)
- W1-3 完全合成型人工酸素運搬体の開発
甲斐俊哉, 木田善規, 福富一平, 帆足洋平, 片山直久, 山本尚志, 大川裕紀, 弘津一郎, 佐藤 誠
(ニプロ株式会社医薬品研究所)
- W1-4 ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸液としての医療利用
高木智史
(株式会社オキシジェニクス)
- W1-5 アルブミン-ヘム製剤の安全性試験に関する検討
小松晃之, 土田英俊
(早稲田大学理工学総合研究センター)

11:15~12:00 教育講演1 司会 西 勝英(熊本大学医学部薬理学第二)

血清アルブミンの構造特性と医薬への応用
小田切優樹
(熊本大学大学院医学薬学研究部)

12:15~13:00 理事会 評議員会

13:00~13:45 教育講演2 司会 北畠 顕(医療法人社団カレスサッポロ)

メタボローム(網羅的代謝解析)技術による赤血球の新しい生理作用の探索 ガスバイオロジーの観点から
末松 誠
(慶應義塾大学医学部医化学教室)

13:45~14:30 招請講演 司会 酒井清孝先生(早稲田大学理工学部応用化学科)

Improving the efficiency of oxygen carriers for blood substitutes
Marcos Intaglietta
(Department of Bioengineering, University of California, San Diego)

14 : 30 ~ 17 : 30 シンポジウム「血液代替物の臨床利用 どのような状態に適用されるか」
司会 平澤博之(千葉大学大学院医学研究院救急集中治療医学)
村田 満(慶應義塾大学医学部内科)

- S-1 ヘモグロビン小胞体による40%血液交換後の回復過程
酒井宏水¹, 堀之内宏久², 武岡真司¹, 小林紘一², 土田英俊¹
(早稲田大学理工学総合研究センター¹, 慶應義塾大学医学部外科²)
- S-2 ウサギ急性出血性ショックモデルへの人工赤血球によるfluid resuscitation の効果
寺嶋克幸¹, 杖下隆哉², 坂本篤裕¹, 小川 龍¹
(日本医科大学麻酔科集中治療室¹, 三井記念病院麻酔科²)
- S-3 Perfluorocarbonを用いたLiquid Ventilationの有効性と問題点
松田兼一, 平澤博之, 平山 陽
(千葉大学大学院医学研究院救急集中治療医学)
- S-4 人工赤血球を用いた人工心肺充填液のfeasibility test
山崎真敬, 饗庭 了, 四津良平
(慶應義塾大学心臓血管外科)
- S-5 Neo Red Cellの心虚血再灌流障害に対する有効性
井坂光宏¹, 佐久間一郎², 石塚隆伸³, 緒方嘉貴³, 安田慶秀¹
(北海道大学大学院医学研究科循環器外科¹, 同循環病態内科², テルモ株式会社研究開発センター³)
- S-6 PEG-BSA resuscitation maintains functional capillary density (FCD) in sepsis
Nanae Hangai-Hoger, Pedro Cabrales, Amy G. Tsai, Marcos Intaglietta
(Department of Bioengineering, University of California, San Diego)
- S-7 Liposome-encapsulated hemoglobin potentiates radiation therapy to suppress cancer growth in mice
Akira T. Kawaguchi¹, Chieko Murayama¹, Youji Tsutsui², Yoshitaka Ogata², Munetaka Haida¹,
Yukihiko Ohizumi¹
(Tokai University School of Medicine¹, Terumo Co Ltd²)

18 : 30 懇親会(於 小樽市銭函 中村番屋)

7月14日(水)

9 : 00 ~ 10 : 00 一般演題 1 座長 酒井宏水(早稲田大学理工学総合研究センター)

- 一般-1 ヘモグロビン小胞体の体内動態解析
宗 慶太郎¹, Robert Klipper², Beth Goins², William T. Phillips², 土田英俊¹
(早稲田大学理工学総合研究センター¹, Univ. Texas Health Science Center at San Antonio²)
- 一般-2 Improvement of tissue pO₂ by hemoglobin site specifically pegylated at Cys-93() during extreme hemodilution studied in hamster window chamber
Pedro Cabrales¹, Belur N. Manjula², Amy G. Tsai¹, Seetharama A. Acharya², Marcos Intaglietta¹
(Department of Bioengineering, University of California, San Diego¹, Departments of Medicine and of Physiology and Biophysics, Albert Einstein College of Medicine, NY²)
- 一般-3 ³置換ヘム誘導体とアルブミン-ヘム複合体の酸素結合
中川晶人, 小松晃之, 土田英俊
(早稲田大学 理工学総合研究センター)
- 一般-4 ¹²⁵Iラベル化ヘモグロビン小胞体の体内動態特性について
安楽 誠¹, 浦田由紀乃¹, 宗 慶太郎², 酒井宏水², 土田英俊², 小田切優樹¹
(熊本大学大学院医学薬学研究部¹, 早稲田大学理工学総合研究センター²)

- 一般-5 高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果
岡村陽介¹, 武岡真司¹, 土田英俊¹, 半田 誠², 池田康夫²
(早稲田大学理工学総合研究センター¹, 慶應義塾大学医学部²)
- 10:00~11:00 一般演題2 座長 小松晃之(早稲田大学理工学総合研究センター)
- 一般-6 ヘモグロビン小胞体(HbV)投与がラット免疫系に及ぼす影響
阿部英樹¹, 山口美樹¹, 藤原満博¹, 酒井宏水², 武岡真司², 土田英俊², 東 寛¹, 池田久實¹
(北海道赤十字血液センター¹, 早稲田大学理工学総合研究センター²)
- 一般-7 Microvascular reponse to exchange transfusion with stored RBC: perfusion and oxygen delivery
Amy G. Tsai, Pedro Cabrales, Marcos Intaglietta
(Department of Bioengineering, University of California, San Diego)
- 一般-8 Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates myocardial ischemia and reperfusion in the rat
Akira T. Kawaguchi¹, Teruhisa Tanabe¹, Munetaka Haida¹, Yoshitaka Ogata²
(Tokai University¹, Terumo Corporation²)
- 一般-9 ヘモグロビン精製工程におけるSD処理を用いたウイルス不活化検討
小島潤也, 木村哲寛, 後藤 博, 上田 努, 筒井洋治, 岡本 武, 稲葉勝利, 金田伸一, 緒方嘉貴
(テルモ株式会社研究開発センター)
- 11:00~11:45 教育講演3 司会 池田久實(北海道赤十字血液センター)
- 止血の分子機構と人工血小板・血小板代替物
池田康夫
(慶應義塾大学医学部内科)
- 11:45~12:30 総会
- 12:45~13:15 大会長講演 司会 水戸迪郎(旭川医科大学名誉教授)
- 血液代替物の臨床利用を目指して
川村明夫
(特定医療法人北楡会札幌北楡病院外科)
- 13:15~14:00 特別講演 司会 土田英俊(早稲田大学理工学総合研究センター)
- 生体内における酸素移動と低酸素症に対する対応
小林紘一
(慶應義塾大学医学部外科)
- 14:00~15:00 一般演題3 座長 佐久間一郎(北海道大学大学院医学研究科循環器内科)
- 一般-10 血流停止させた細動脈内のヘモグロビン小胞体からの酸素放出挙動
酒井宏水¹, Pedro Cabrales², Amy G. Tsai², 武岡真司¹, Marcos Intaglietta², 土田英俊¹
(早稲田大学理工学総合研究センター¹, Department of Engineering, University of California, San Diego²)
- 一般-11 虚血 - 再開通モデルラットにおける脳機能不全の多角的評価と人工酸素運搬体の有効性に関する検討
富樫広子¹, 佐久間一郎², 山口 拓¹, 尾谷 浩¹, Subrina Jesmin², 掛端 仁³, 緒方嘉貴⁴,
石塚隆伸⁴, 仲井邦彦⁵, 吉岡充弘¹
(北海道大学大学院医学研究科神経薬理¹, 循環病態内科学², 侵襲制御医学³,
テルモ株式会社研究開発センター⁴, 東北大学院医学研究科環境保健医学⁵)

- 一般-12 脳局所微小循環レベルにおける酸素代謝の光学的解析法
塚田孝祐¹, 末松 誠¹, 南谷晴之²
(慶應義塾大学医学部医化学教室¹, 慶應義塾大学理工学部物理情報工学科²)
- 一般-13 Liposome-encapsulated hemoglobin limits area of cerebral infarction in the rat
Akira T. Kawaguchi¹, Munetaka Haida¹, Hideo Tsukada², Yoshitaka Ogata³
(Tokai University¹, Hamamatsu Photonics², Terumo Corporation³)
- 一般-14 Liposome-encapsulated hemoglobin suppresses vulnerability and improves reversibility of ventricular fibrillation in ischemic canine myocardium
Akira T. Kawaguchi¹, Kazutane Usui¹, Teruhisa Tanabe¹, Yoshitaka Ogata², Munetaka Haida¹
(Tokai University School of Medicine¹, Terumo Co Ltd²)

15 : 00 ~ 17 : 00 ワークショップ2「人工免疫グロブリン, リコンビナントアルブミンの開発状況」

司会 阿岸鉄三(板橋中央総合病院血液浄化療法センター)

笠井正晴(特定医療法人北楡会札幌北楡病院内科)

- W2-1 ヒト血清アルブミンの消失に関与するアミノ酸残基の解析 ~ Site に存在するArg-410の重要性 ~
岩尾康範¹, 安楽 誠¹, 山崎啓之¹, 川井恵一², 丸山 徹¹, 小田切優樹¹
(熊本大学大学院医学薬学研究部¹, 金沢大学医学部保健学科²)
- W2-2 組換えヒト血清アルブミンの構造及び機能解析
中島和幸¹, 岡村 宏¹, 小田嘉明¹, 柴田伸一¹, 宮津嘉信¹, 溝上 寛¹, 船津昭信¹, Peter Kiessling²
(財団法人化学及血清療法研究所¹, ZLB Behring²)
- W2-3 リコンビナントアルブミンの開発状況
小林 薫
(三菱ウェルファーマ株式会社蛋白医薬研究所)
- W2-4 治療薬としてのヒト抗体開発の現状
黒澤良和
(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)
- W2-5 免疫グロブリンの血管炎抑制効果と人工化
鈴木和男
(国立感染症研究所生物活性物質部)
- W2-6 抗体工学の進歩と癌治療
太田 聡
(協和発酵工業株式会社東京研究所)

参加費 1万円(懇親会費を含む)

総会事務局

特定医療法人 北楡会 札幌北楡病院
第11回日本血液代替物学会年次大会 事務局長 中尾康夫
〒003-0006 札幌市白石区東札幌6条6丁目5-1
電話: 011-865-0111 FAX: 011-865-9719
e-mail: 11jbs@hokuyu-aoth.org
<http://www.hokuyu-aoth.org/11jbs>

Fluosol-DAの補体活性化に関する回顧的考察

Retrospective discussion on complement activation by Fluosol-DA

津田良夫

Yoshio Tsuda

和文抄録

約20年前の臨床試験において、Fluosol-DAを投与した患者でショック様症状がまれに出現することから、イヌを使って循環動態に及ぼす影響を検討した。その結果、0.5～1mLという少量投与で、投与後1分以内に白血球数及び血小板数の急激な減少と、それに伴う肺動脈圧の上昇及び全身血圧の低下が全例に観察された。この反応は補体の活性化に基づくことが報告されている。すなわち、補体活性化に基づくショック反応とみなされている、移植時の超急性期の拒絶反応並びにセロファン透析膜によるショック反応に関する文献を参考に、Fluosol中のPFC粒子の界面活性剤の膜が循環血液中で剥がされ、剥き出しとなったPFC界面が生体不適合な素材として補体を活性化するという仮説を立て、Fluosolの補体活性化の機序に関して、回顧的な考察を行った。

Abstract

Two decades ago, Fluosol-DA had been reported to induce shock-like adverse reactions in clinical experiments, although they were rare cases. Whereas, anaphylactic reaction was happened in all dogs injected with 0.5 to 1.0 mL of Fluosol. The transient and severe reaction in dog was featured by pulmonary hypertension and systemic hypotension accompanied with leukopenia and thrombopenia within a minute after injection. The activation of serum complement seemed to act as a trigger of this chain-reaction. Both hyperacute rejection in guinea pig-to-rat xenoplatation and first use syndrome by cellophane membrane dialyser seemed to be of typical examples intrinsically-linked to complement activation. Refer to these reports, a hypothesis was set up, which the surfactant layer around the PFC particles would be easily removed in the circulation and the boundary face of the PFC particle might lose something biocompatible to activate serum complement.

Keywords

Fluosol-DA, Perfluorochemicals, Emulsion, Initial shock, Complement activation.

始めに

今から20年近く前に実施した、酸素輸液に関連した研究データの一旦を紹介したい。当時、ペルフルオロ化合物を使った酸素輸液を何とか世に出したいと考え、様々な検討を実施していたが、製剤的な問題、薬効上の問題あるいは副作用の問題等の障壁が高く、十分な成果が得られないまま終了した。その後、過去の経緯を振り返って、何故失敗したのか、どこに問題があったのか、それらの問題点は次の研究テーマに活かせないかを考えることもない訳ではない。しかし、酸素輸液の研究から遠ざかり、最新の研究成果をフォローしていない状況では、当時の疑問点は未解決のまま放置されているのが実情である。今回、取り上げたinitial shockについては、過去の問題として既に解決されているか可能性もあるが、識者の方々より、実験の解釈

の仕方及び考察について、ご教授いただければと考え、まとめてみた。

ペルフルオロ化合物(以下、PFCと略す)に関しては、本誌に東北大学・仲井の総説により、詳しく紹介されている¹⁾。我々が研究していたPFC乳剤(Fluosol-DA, FC-43 Emulsion)は第一世代とみなされるものである。PFCは酸素を良く溶かし、生体内において不活性であることから、赤血球の代用としての利用が考えられた。PFCは水に溶けず、投与に際しては乳化剤で乳化する必要がある。製剤的な問題点として、静脈内投与可能な程度の粘度で、安定な乳剤を作るためには、PFC濃度を25 w/v%程度に抑える必要があった。PFCの比重は約2なので、v/v%で表すと10～15%程度の濃度であった。原液の酸素溶解能は水の20倍と高くとも、PFC乳剤中の溶存酸素量は水の3倍

程度にしかならなかった。その結果、十分な酸素運搬能を与えるために、吸入酸素濃度を高める必要があり、このことは緊急時の使用にとって、面倒な操作や準備が必要であることを意味していた。一方、投与された乳剤は異物として網内系組織に取り込まれ、循環血液中から比較的速やかに消失した。長時間の酸素運搬能を期待するには、投与量を上げる必要があるが、PFCは網内系組織に長期間蓄積する問題もあった。PFCは化学的・生物的に不活性であり、代謝されないことから、尿・胆汁中への排泄がまったく認められず、呼吸からのみ排泄されること²⁾より、体外への排泄に時間を要した。

上に列記した問題点はPFCの根幹に係わる問題ではあったが、予測された問題点であった。一方、予測していなかった臨床での問題点として、Fluosol投与直後、ショック様の反応が認められた点である。Tremperにより、0.5mLのFluosolのtest doseで、一例に一過性の息切れ、胸部痛、徐脈、また他の一例に胸部圧迫感、白血球数の減少等のショック様の反応が報告された³⁾。日本における臨床試験でも、OhyanagiはFluosol投与により、白血球数、血小板数の低下を認めた⁴⁾。この反応に関して、渡辺はイヌを使って補体の関与したアナフィラキシー反応が起きていることを報告している⁵⁾。すなわち、Fluosolをイヌに少量投与するだけで、補体が活性化され、それが引き金となり、血小板、白血球が凝集し血中における血小板、白血球数が低下する。凝集した白血球は肺毛細管内に沈積し、その結果、肺動脈圧の上昇、さらには全身血圧の低下に繋がる。これらの一連の反応は一過性であり、1時間程度で回復したと報告している⁵⁾。但し、何故、補体が活性化されるのか、その機序については言及していなかった。このショック様反応は、ステロイドの前投与により、補体活性化の cascadeのきっかけが抑えられたこと⁶⁾から、臨床試験においては、制御できない副作用ではなかったが、上市後の緊急時に使用される場合、この副作用の出現は大きな懸念点であった。

Fluosolによる補体の活性化という問題に対して、我々は製剤的な検討を行っていた。同時に、PFC乳剤そのものの酸素運搬能や、体内からの消失の遅さから、失血時の赤血球の代替物としての利用は難しいものと判断し、新しい適応症の模索を行っていた。すなわち、放射線や抗がん剤と併用した酸素増感剤としての適応の可能性であり⁷⁾、経皮的冠動脈拡張術(PTCA)施行時の酸素補給剤としての役割である⁸⁾。最終的に、Fluosolは米国FDAより、PTCA時の自己血の代わりに酸素供給用輸液として承認を受けた。但し、臨床治験での目標とされた、PTCA後の再狭窄の予防に関しては、残念ながら明確な効果を証明することができず、酸素輸液の研究はストップすることになった。その結果、製剤的な検討課題となっていた補体の活性化という懸念点も決着を着けずに終了した。

以下に、各種乳化剤で乳化したPFC乳剤を使って、補体の活性化に伴うイヌ循環動態に及ぼす影響を比較した実験、並びに補体の活性化に伴うショック反応に関連した文献報告を基に、補体活性化の機序について考察した。

実験方法

1. イヌ循環動態試験

(株)ケアリーより購入した体重8~14 kgの雌雄雑種成犬を用いた。sodium pentobarbitalを25.6mg/kg静脈内投与により麻酔後、0.5mg/head/minで維持麻酔を行った。動物を背位に固定後、血圧測定のため右頸動脈にポリエチレンカテーテルを挿入留置した。肺動脈圧測定並びに混合静脈血採血のため、右大腿静脈よりSwan-Ganzカテーテル(5F)を挿入し、その先端を肺動脈内に留置した。さらに、動脈血採血のため、右大腿動脈にカテーテルを挿入留置した。動脈圧及び肺動脈圧は、圧トランスデューサー(日本光電、AP620G)を介して、呼吸数は気管内チューブに装着したサーミスタ呼吸ピックアップ(日本光電)を介して、心電図は第 誘導法にてポリグラフ上に記録した。被検薬剤の投与は右大腿静脈に挿入したポリエチレンカテーテルより、0.5~1.0mLの投与量を30秒間で投与した。循環系パラメータの測定は薬剤投与後30~60分まで行った。赤血球数、白血球数及び血小板数(TOA microcell counter CC-120及びPL-100)は薬剤投与前、投与後3, 10, 30, (60)分に測定した。30~60分の観察終了後、血圧等の変動の認められなかった動物個体については、最後にFluosolを投与し、血圧反応性を確認した。

2. 乳剤の調製

卵黄リン脂質(YPL)又はPhosphatidylcholine(PC)15gに水約100mLを加え、窒素ガス気流下、ホモゲナイザー(Biotron)で混合攪拌する。得られた乳化剤の懸濁液に、ペルフルオロ化合物(PFC)を125g 加え、さらに温水を加えて、500 mLとし、ホモゲナイザーで攪拌する。得られた粗乳化液をGaulin homogenizerに移して乳化した。乳化条件は第 段圧460kg/cm²、第 段圧100kg/cm²とし、液温を50 以下に冷却しながら、30分間乳化した。乳剤は0.65 μmのメンブランフィルターでろ過後、50mL容バイアルに分注・密栓し、121 , 5分間のオートクレーブ滅菌を施した。滅菌後は冷蔵保存した。

Table 1. The emulsions used in the dog hypotensive study and the hyperacute rejection study.

Emulsion	Product name	Disperse phase	Emulsifying agent
PFC/F68-YPL emulsion	(Fluosol-DM)	F68&FTPA	Pluronic F68 2.4% YPL 0.5%
PFC/F68 emulsion	(FC-43 Emulsion)	FC-43	Pluronic F68 3.2%
PFC/YPL emulsion		FMIQ	Tolk Phospholipids(YPL) 4%
PFC/PC emulsion		FMIQ	Phosphatidylcholine(PC) 4%
SIB/YPL emulsion	(Intralipos)	Soybean oil	YPL 1.2%
SIB/F68 emulsion		Soybean oil	Pluronic F68 3.2%

旧ミドリ十字（株）が製造したFluosol-DA及びFC-43 Emulsionはいずれも上記とほぼ同様の方法により、製造規模で調製され、500mL容器に400mLずつ分注したものである。使用直前に添付された塩溶液を100 mLずつ加えて等張化した。実験に供した乳剤の種類と、その組成をTable 1に示す。

実験結果

1. イヌ循環動態試験-実験1 (YPL乳剤とPluronic乳剤の比較)

最初に、乳化剤としてYPLで乳化したPFC乳剤を、麻酔下のイヌに0.5mL静脈内投与したが、Figure 1に示すように、血圧及び肺動脈圧に対して、全例（4例とも）何ら影響を及ぼさなかった。次に、何ら反応を示さなかった同一個体にFluosolを投与すると、投与直後より肺動脈圧の急激な上昇及び動脈血圧の低下が全例に認められた。Fluosol投与によるイヌ血圧降下は投与後1分で最大となり、前値の20%にまで低下した。以降、徐々に回復し、投与後30分で前値の75%にまで回復した。肺動脈圧の変動は投与後30秒～1分で急激に上昇しピークに達し、以降速やかに低下し、投与後3分ではほぼ前値に戻った。心拍数に関しても、リン脂質乳剤では影響が認められなかったが、Fluosolでは持続性の心拍数の低下（Figure 1）及び投与直後に呼吸困難が認められた。

典型例として、動物番号1-1の呼吸・循環器系パラメータ

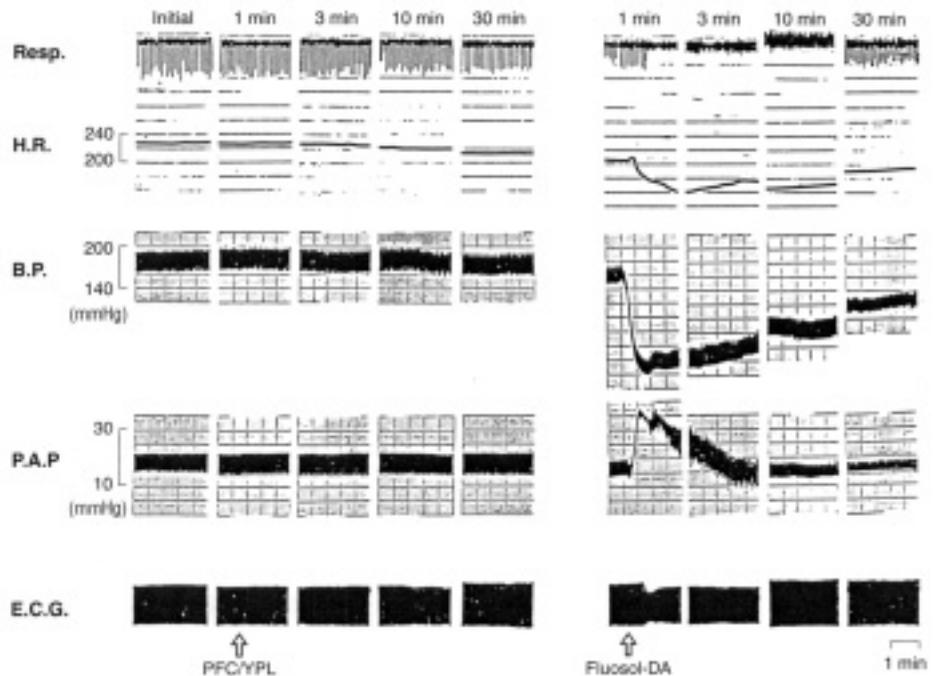
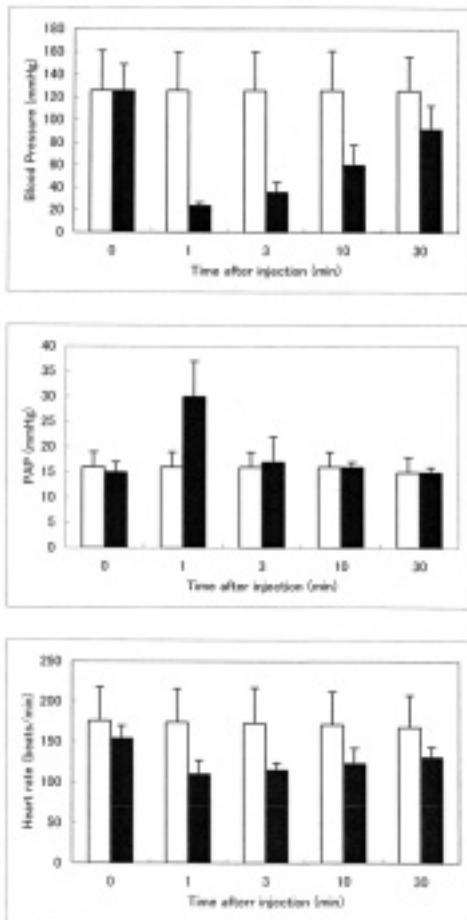


Figure 2. Typical changes in circulatory dynamics after injection of PFC/YPL emulsion and Fluosol-DA in a dog (No.1-4).

Figure 1. Changes in blood pressure, pulmonary arterial pressure and heart rate after the successive injection of PFC/YPL emulsion and Fluosol-DA in four dogs. (White column: PFC/YPL emulsion, Black column: Fluosol-DA)

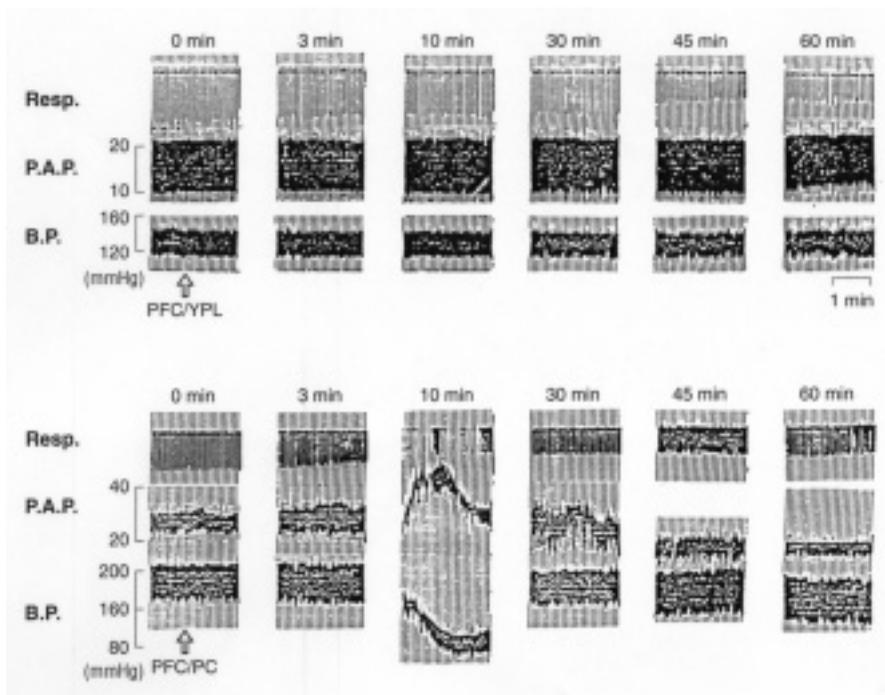
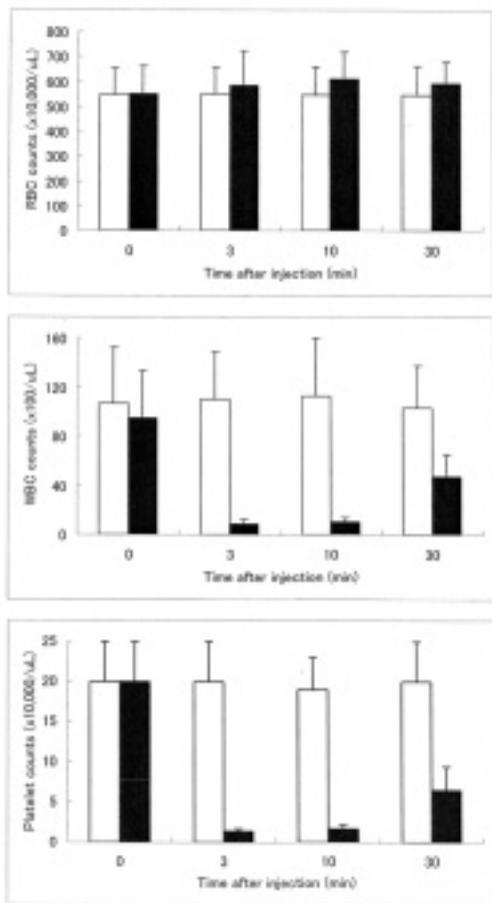


Figure 4. Typical changes in circulatory dynamics after injection of PFC/YPL emulsion in a dog (No.2-1) and PFC/PC emulsion in a dog (No.2-5).

Figure 3. Changes in red blood cell counts, white blood cell counts and platelet counts after the successive injection of PFC/YPL emulsion and Fluosol-DA in four dogs. (White column: PFC/YPL emulsion, Black column: Fluosol-DA)

た (Table 2). Fluosol の場合には、投与直後より急激な降圧反応が見られたのに対して、PC 乳剤の場合には、投与後10分から30分にかけて低下し、その後回復する推移を示した。典型的な例では10分後、血小板数及び白血球数の50%以上の低下に

Table 2. Summary of response in circulatory dynamics after injection of PFC/YPL emulsion, PFC/PC emulsion and PC suspension to each three dogs.

	No.	BP	P.A.P	WBC	platelet
PFC/YPL	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
PFC/PC	4	-	-	-	-
	5	↘	↗	↓	↓
	6	↓	↘	↓	↓
PC	7	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	9	-	-	-	-

- : No change
 ↓ : Change over 50% down
 ↘ : Change over 20% down
 ↑ : Change over 50% up

連動して、肺動脈圧の上昇、全身血圧の増加が認められた。肺動脈圧はその後、前値よりも低下した (Figure 4)。

PE を除く際、アルミナで処理したが、アルミナから血圧降下性の不純物が混入した可能性を考え、シリカゲルによるPCの精製も試みた。しかし、シリカゲル処理PC乳剤も、血小板数、白血球数等の低下が認められた (データ不掲載)。一方、乳化剤そのもの、すなわちPC suspension を単独で投与したが、循環動態の変動はまったく認められなかった (Table 2)。

考察

上記した実験結果の考察に移る前に、補体の関与したショック様症状に関連する2つの実験データを紹介したい。

1) 異種間移植時の超急性拒絶反応⁹⁾

異種間移植時の超急性拒絶反応を抑える目的で、このInitial shock が利用できないかという試みが、医療法人北楡会・人工臓器・移植・遺伝子研究所の田中・玉置らのグループで実施され、興味ある結果を報告している⁹⁾。サンプルの提供者として、少々長くデータを引用する。FC43 Emulsion を前投与することによって、異種 (モルモット-ラット) 間の心肺移植における生着延長効果を検討した。無処置の場合には、0.19 時間で拒絶されたが、FC43 Emulsion を投与した群では11.67 時間となり、著明な延長効果があった。同時に、正常ラットを使い、FC43 Emulsion 投与後の補体活性の推移も検討しているが、投与直

後よりACH50値が顕著に低下した。

次に、FC43 Emulsion (FC43/ Pluronic) の代わりに、PC43/YPL乳剤、大豆油をPluronicで乳化した乳剤 (SOB/Pluronic)、大豆油をYPLで乳化した乳剤 (市販の脂肪乳剤: SOB/YPL) を投与したときの生着延長効果を検討した。その結果、無処置群、FC43/ Pluronic群、PC43/YPL群、SOB/Pluronic群及びSOB/YPL群の生着時間は、それぞれ0.19時間、10.75時間、0.66時間、1.11時間及び0.23時間であった。また、ACH50値はそれぞれ1.04、0.15、0.67、0.61及び1.14であった。延長効果はFC43/ Pluronicで際立っていたが、PC43/YPL及びSOB/ Pluronicでも、僅かに血漿中の補体活性の低下があり、生着延長効果も無処置群とは有意差があった。なお、Pluronic溶液を単独に投与した場合には、補体の変動は認められなかった。

超急性拒絶反応の機序として、補体、特に alternative pathwayの活性化が惹起されることが知られている。この活性化経路を抑制する薬物によって、生着時間が延長することは知られており、田中の結果でも、循環血中の補体を除くことによって、生着時間が延長した。また、興味深い結果としてPC43/YPL乳剤あるいはSOB/ Pluronic乳剤でも補体への影響が認められた。

2) セロファン膜透析装置による白血球減少症^{10,11)}

Craddock^{10,11)} は、セロファン膜を使った透析装置で透析開始後30分以内に、急激で一過性の白血球数の低下を認め、呼吸機能の低下を観察している (First use syndromeと名付けられている現象¹²⁾。) これは、白血球が肺に集まるために起こる現象と判断され、この臨床症状を再現するために、予めセロファン膜とインキュベートした自己血を戻したウサギやヒツジにおいて、白血球 (好中球、単球) の著名な減少と肺毛細管内に蓄積していることを確認した。このような白血球の凝集の原因としては、セロファン膜に接触することによって補体の活性化が起き、それが引き金となっていることを報告している。なお、この報告では、血小板数は変動しなかった。白血球の凝集と血小板の凝集には別の因子が関与しているものと考えられる。

透析膜による白血球減少症は日本においても報告されている¹³⁾。ただし、欧米人に比べてその頻度は少ないようである。阿岸らは、セルロース系透析膜を用いた血液透析におけるFirst use syndromeと同じような現象を、ABO血液型不適合者間における腎移植手術時に経験している¹³⁾。すなわち、免疫吸着を応用する抗体除去カラムにレシピエントの血液を通過させた際、補体の活性化が観察された。腎移植患者27名中4名はアナフィラキシー様症状のために、抗体除去を断念した。

補体の活性化は膜材料の生体不適合性を示す一つの指標と考えられている。また、First use syndromeは透析膜の初回使用時に起こり、再使用によってその症状が次第に軽減する。透析膜によるFirst use syndromeに関しては、1960年以降盛んに研究され、透析膜の改良研究が進められている。セルロース膜の遊離の水酸基を三級アミノ基で置換する方法や、合成高分子系

膜が多数開発されている。現在、生体適合性に優れていると言われている合成高分子系のポリスルホン膜でも、生体不適合の患者もゼロではないとのことである¹⁴⁾。

3) 実験動物に関する考察

透析時のFirst use syndrome発現率に人種差が示唆されていた¹³⁾が、補体の活性化、あるいはその後のショック症状への頻度と症状の激烈度には種差が存在するようであった。Fluosol投与によるイヌにおける激しいinitial shockは再現性良く、ほぼ全例で認められた。ヒトではFluosol投与により、少数例で一過性の息切れや胸痛が観察され、白血球数の低下等が報告されているが、血圧低下やアナフィラキシー様ショックの報告はない。異種間移植実験のラットで補体の変動が示されていたが、Fluosol投与後のラットでは、必ずしも全身血圧には影響までは認められていなかった。

一方、透析膜の評価に、ウサギ及びヒツジで実験した例¹⁰⁾を引用したが、ヒト血液を使ったex vivoの評価系を構築し、補体の変動を指標に透析膜の材質比較、すなわち生体適合性を検討している報告は多い¹⁵⁾。ヒトで確かめるのがもっとも確実な方法と思われるが、乳化剤のリン脂質組成比較のような微妙な循環動態への影響を調べるためには、イヌ (あるいは、ウサギ、ヒツジ) を使うことがもっとも感度が良いのではないかと推測している。

4) 生体適合性に関する文献的考察

国立循環器病センター・松田の総説¹⁶⁾によると、人工材料の表面で補体系が活性化されると、アナフィラトキシンが生成し、好中球やマクロファージが集まり活性化される。血液との比接触面積が大きい人工臓器、例えば人工肺や人工透析の場合には、アナフィラキシーショックが観察されることがある。これは活性化された好中球が凝集塊をつくり、末梢で血行障害を引き起こすためと考えられている¹⁶⁾。また、補体の活性化に先立って、材料表面へのタンパクの吸着が引き金となることが知られている。タンパク質を吸着させ難い材料として、非イオン性の親水性高分子が表面に移植されており、この鎖が大きな易動性を有して、全体として散漫構造を有していることが必須である¹⁶⁾。松田の透析膜の表面修飾に関する文献¹⁷⁾では、親水性・疎水性ブロックのコポリマーを修飾することによって、血小板の粘着を抑えることを報告している。疎水性部分が膜に錨となり、親水性部分が表面に存在する形が考えられている。

材料表面にタンパク質が結合して被覆した場合に、補体の活性化が抑えられることが考えられる。透析膜の再使用により、ショック様症状が次第に軽減されることの説明となる。このような、生体適合性に関する説明からは、タンパク質のPEG修飾のことが念頭に浮かぶ。血中滞留時間を延長させるために、タンパク質のPEG修飾が盛んに試みられているが、生体適合性を上げるための作用が働いている可能性がある。

5) 乳剤投与後の血中存在状態についての仮説

イヌ血圧低下作用はPFC乳剤を少量投与することにより生じられた。乳化剤を単独で、すなわちPluronic水溶液（データ不掲載）やPC suspensionを投与しても、循環動態は変動しなかった。また、異種間移植においても、Pluronic溶液ではまったく生着延長効果を認めなかった⁹⁾。界面活性剤の種類によっては、単独で投与するだけで、激的な血圧低下作用を示す例もある¹⁰⁾が、今回の補体活性化とは異なる機作によるものと考えざるを得ない。

PFC/Pluronic (Fluosol) 乳剤を投与後、界面活性剤Pluronicの尿中への排泄は非常に速やかである。適当な発表データはないが、乳剤の形で投与した場合も、単独でPluronic溶液を投与した場合も、尿中へのPluronicの排泄は一定で、速やかである。血中においては、乳剤の分散相 (PFC) の周りにはPluronicは存在せず、粒子は剥き出しの状態が存在している可能性が考えられる。Fluosolの場合には、0.5%のYPLが乳化剤として添加されているが、PFCの全表面を覆いつくすには不十分な量と考えられる。すなわち、大豆油脂乳剤にとっては、10~20%の分散相の濃度に対して1.2%のYPLが必要であり、脂肪乳剤に比較しさらに小さな粒子径のFluosolにとっては0.5%YPLは少なく、Pluronicが界面膜上に存在しなければ、粒子は剥き出しの状態と考えられる。例えば、脂肪乳剤のリン脂質膜は比較的安定であると思われるが、脂肪粒子が循環血液中のリポ蛋白質からアポ蛋白やコレステロールを引き抜くとの報告がある¹⁰⁾。乳剤粒子の界面膜は固定された一定の存在ではなく、剥がれたり、二重に折重なっていることも考えられる。

一つの仮説として、剥き出しになった分散 (PFC) 相が補体活性化の原因と考えられないだろうか？ 剥き出しの粒子表面は疎水性であり、タンパク質が吸着しやすい状態と考えられる。Pluronicの場合には分散相PFCとの親和性が小さく、容易に剥がれるために、補体関連蛋白が結合し、補体の活性化を引き起こすことが考えられる。また、大豆油 / Pluronic乳剤や、PFC / YPLとの組み合わせでも、生着延長効果が多少認められた。このことは、PFCそのものが補体の活性化を示すと考えるよりは、物理的な存在状態に依存して、言葉を変えるならば、生体適合性を持たない素材が剥き出しとなったため、反応が惹起されたと考えられる。当然、分散相の差、すなわち、大豆油と比較してPFCのような高比重の液体は、より生体適合性に乏しい素材である可能性は高いだろう。

イヌ循環動態試験（実験2）においては、YPLとPC乳剤で反応性に差が生じた。この場合も、上の仮説を当て嵌められるかもしれない。生体内のPE (Phosphatidyletanolamine) はPCよりも高度不飽和脂肪酸 (DHA等) の含有率が高い。乳化性にはYPLとPCとでは差はなかったが、循環血液中での安定性には差があるのかもしれない。YPLは生体膜と似通った組成比、脂肪酸の種類を含有するのに対して、PEを除いた場合、高度不飽和脂肪酸の含有率が低下し、乳剤の界面膜が不安定となることが考えられる。例えば、高度不飽和脂肪酸の少ないPCの界面膜はYPLに比較しむしろ、循環血流中で剥がれ落ちることが想像できないだろうか。PFC / PC乳剤投与後10~30

分のタイムラグの後、血圧の変動が認められたことも、粒子が剥き出しになるまでの時間と考えれば頷ける現象かもしれない。

6) 投与量と補体活性化の可能性

イヌ循環動態試験における際立った特徴として、Fluosolの投与量が0.5~1 mLと体重約10kgの動物への投与量としては、非常に少ない投与量で反応が起きることである。少なくとも失血の補いのためには、数百 mLの投与量が必要であり、非常に少ない投与量と言わざるを得ない。このような少量の投与量で“剥き出しのPFC粒子”が補体活性化の引き金となるのか試算してみた。計算を簡単にするために、PFC粒子の半径を0.1 μ mとし、乳剤として1 mL、すなわちPFCとして0.1 mLを投与すると、全PFC粒子の表面積は3 m^2 と計算される。当然、すべての粒子が剥き出しの状態では存在せず、また、投与された粒子の一部は速やかに網内系組織に取り込まれ、循環血液から除外される場合もあるだろう。これほど大きな表面積 (3 m^2) が補体成分とが接触する訳ではないが、血液透析膜 (0.2~2.3 m^2)¹⁴⁾に匹敵する表面積であり、補体の活性化にとっては十分な表面積と考えられる。

このような仮説を本来ならば実験で確かめていく必要があるのだが、生体適合性という観点から想像をたくましく仮説を立ててみた。最後に、20年近く前の実験の紹介であり、当時の研究担当者はほとんど職場が変わり、残っているのは我一人という状況である。イヌ循環動態の実験は、かつての研究仲間であった渡辺正弘、花田秀一、久保佳史、結城隆、村島良一郎、嶋原正一の各氏が実施したものであることを付記する。

参考文献

1. 仲井邦彦, 佐久間一郎, 福島昭二, 竹内由和, 佐藤洋, 北畠顕. パーフルオロカーボン (PFC): 第2世代PFCによる挑戦. 人工血液. 2000; 8: 43-51.
2. Tsuda Y, Nakura K, Yamanouchi K, Yokoyama K, Watanabe K, Ohyanagi H, Saitoh Y. Study of the excretion mechanism of a perfluorochemical emulsion. Artif Organs 1989; 13: 197-203.
3. Tremper KK, Friedman AE, Levein EM, Lapin R, Camarillo D. The preoperative treatment of severely anemic patients with a perfluorochemical oxygen transport fluid, Fluosol-DA. N Engl J Med 1982;307:277-.
4. Ohyanagi H, Nakaya S, Okumura S, Saitoh Y. Surgical use of Fluosol-DA in Jehovah's witness patients. Artif Organs 1984;8:10-18.
5. 渡辺正弘, 大柳治正, 斎藤洋一. 酸素輸液フルオゾールD Aのアナフィラキシー様作用に関する基礎的検討. 人工臓器. 1988; 17(4): 1513-1522.
6. Vercellotti GM, Hammerschmidt DE, Craddock PR, Jacob HS. Activation of plasma complement by perfluoro-carbon artificial blood: probable mechanism of adverse

- pulmonary reactions in treated patients and rationale for corticosteroid prophylaxis. *Blood* 1982; 59: 1299-1304.
- 7 . Teicher BA, Rose CM. Perfluorochemical emulsions can increase tumor radio-sensitivity. *Nature* 1984; 223: 934-936.
 - 8 . Anderson HV, Leimgruber PP, Roubin GS, Nelson DL, Gruntzig AR. Distal coronary artery perfusion during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1985; 110: 720-726.
 - 9 . 田中三津子, 玉置透, 川村明夫, 横田亘弘, 小島僚太郎, 石倉浩, 吉木敬 . Perfluorochemical (FC43) による異種心移植片の生着延長効果 FC43構成成分による選択的補体活性化に関する比較検討 . *日本移植学会雑誌* . 1997 ; 32 : 159-167 .
 - 10 . Craddock PR, Fehr J, Brigham KL, Kronenberg RS, Jacob HS. Complement and leukocyte-mediated pulmonary dysfunction in hemodialysis. *N Engl J Med* 1977; 296: 769-774.
 - 11 . Craddock PR, Fehr J, Dalmaso AP, Brigham KL, Jacob HS. Hemodialysis Leukopenia: Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J Clin Invest* 1977; 59: 879-888.
 - 12 . Ing TD, Ivanovich PT, Daugiradas JT. First-use syndrome and hypersensitivity during hemodialysis: Some pieces of the puzzle are falling into place. *Artif Organs* 1987; 11: 79-81.
 - 13 . 阿岸鉄三, 高橋公太, 八木沢隆, 太田和男, 高橋和男. 抗A・抗B抗体用吸着剤使用時のアナフィラキシー様症状 . *人工臓器* 1991; 20: 1357-1360
 - 14 . 酒井清孝, 金森敏幸 . 医療における膜材料 . 清水剛夫, 軽部征夫, 吉川正和, 民谷栄一編 . 第 巻 生体機能類似膜編 . 東京 : 共立出版 , 1994 ; 260-317 .
 - 15 . Mulvihill J, Crost T, Renaux JL, Cazenave JP. Evaluation of haemodialysis membrane biocompatibility by parallel assessment in an ex vivo model in healthy volunteers. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1968-1973.
 - 16 . 松田武久 . 生体现象と界面化学 . *Pharm Tech Japan* 1996 ; 12 : 331-339
 - 17 . Matsuda T, Ito S. Surface coating of hydrophilic-hydrophobic block co-polymers on a poly(acrylonitrile) haemodialyser reduces platelet adhesion and its transmembrane stimulation. *Biomaterials* 1994; 15: 417-422.
 - 18 . Lorenz W, Schmal A, Schult H, Lang S, Ohmann C, Weber D, Kapp B, Luben L, Doenicke. Histamine release and hypotensive reactions in dogs by solubilizing agents and fatty acids: Analysis of various components in cremophor E1 and development of a compound with reduced toxicity. *Agents and Actions* 1982; 12: 64-80
 - 19 . Carpentier YA. Intravascular metabolism of fat emulsions: THE ARVID WRETLIND LECTURE, ESPEN 1988. *Clin Nutr* 1989; 8: 115-125.

血小板膜タンパク結合アルブミン重合体による 血流条件下コラーゲン表面における血小板血栓増強効果

Enhancing Effects of Albumin Polymers Bound with Functional Recombinant Fragment of Platelet Specific Membrane Glycoproteins on Platelet Thrombus Formation on the Immobilized Collagen Surface Under Blood Flow Conditions.

田村典子¹⁾, 後藤信哉¹⁾, 石田英之²⁾, 半田俊之介¹⁾, 田邊晃久¹⁾, 武岡真司³⁾, Athar Sadiq¹⁾, 池田康夫⁴⁾

Noriko Tamura¹⁾, Shinya Goto¹⁾, Hideyuki Ishida²⁾, Shunnosuke Handa¹⁾, Teruhisa Tanabe¹⁾, Shinji Takeoka³⁾, Athar Sadiq¹⁾, and Yasuo Ikeda⁴⁾

和文抄録

血小板は、血管壁の損傷部位に集積し一次止血に関与する。血流条件下では、血管壁損傷部位で血流に暴露されたコラーゲンと血小板の相互作用、コラーゲンに結合する血漿蛋白であるvon Willebrand因子（VWF）と血小板の相互作用が血栓形成に必須の役割を果たす。そこで、血小板表面上に存在するコラーゲン受容体であるGPIa/IIa（recombinant GPIa/IIa：rGPIa/IIa）VWF受容体であるGPIb（recombinant GPIb：rGPIb）を結合させたアルブミン重合体を作成し止血機能におよぼす効果を検討した。

血管壁の損傷部位で血流に曝露されるマトリックスであるコラーゲンを固相化したガラス表面上に抗凝固処理した全血を灌流するモデルを用いた。あらかじめnative血小板、rGPIa/IIa、rGPIbと結合したアルブミン重合体を蛍光標識して赤血球の存在下における観察を可能とした。蛍光顕微鏡により観察される、 $1,500\text{ s}^{-1}$ のずり速度における血小板血栓の2次元成長は、rGPIb結合アルブミン重合体により促進した。一方、 100 s^{-1} のずり速度下ではrGPIb、rGPIa/IIa結合アルブミン重合体はいずれも血小板血栓の形成を促進する効果を呈した。高速共焦点レーザー顕微鏡による3次元イメージング法により、rGPIb結合アルブミン重合体は $1,500\text{ s}^{-1}$ のずり速度の条件における血栓の3次元成長を促進することが確認された。コラーゲン、VWFの受容体機能を有する血小板膜糖タンパクを結合させたアルブミン重合体は、血流条件下におけるマトリックス表面の血小板血栓の形成を増強させる人工血小板としての効果を有することが確認された。

Abstract

Platelet plays an important role in hemostasis by accumulating at sites of vascular injury. Interaction between exposed subendothelial matrix such as collagen or von Willebrand factor with their corresponding platelet surface receptors of GPIa/IIa and GPIb are essential for platelet adhesion and thrombus formation. We tested the effects of albumin polymers bound with GPIa/IIa and GPIb in supporting platelet thrombus formation occurring under blood flow conditions.

Blood specimens containing reduced number of platelets, which were rendered fluorescent by addition of mepacrine, were perfused on the immobilized type I collagen surface at wall shear rates of 100 s^{-1} and $1,500\text{ s}^{-1}$ in the presence or absence of fluorescinated albumin polymers bound or not bound with GPIa/IIa or GPIb. Effects of those albumin polymers in supporting two-dimensional and three-dimensional growth of platelet thrombi were detected by fluorescent microscopy and ultra-fast laser confocal microscopy equipped with piezo-motor control unit. Albumin polymer bound with GPIb enhanced both two-

1) 東海大学医学部内科学系 〒259-1143 神奈川県伊勢原市下糟屋143 Department of Medicine, Tokai University School of Medicine, 143 Shimokasuya Isehara, Kanagawa 259-1143, Japan

2) 東海大学医学部基礎医学系 Department of Basic Medicine, Tokai University School of Medicine

3) 早稲田大学理工学総合研究センター Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

4) 慶應義塾大学医学部内科学教室 Department of Medicine, Keio University School of Medicine

論文受付 2004年3月26日 受理日 2004年4月22日

dimensional and three-dimensional growth of platelet thrombi occurring under a shear rate of $1,500 \text{ s}^{-1}$, while those bound with GPIa/IIa tend to enhance only in two-dimensional growth occurring at relatively low shear rate of 100 s^{-1} . Our results suggest that albumin polymer bound with platelet surface receptor proteins, especially GPIb, will be useful as artificial platelets supporting platelet thrombus formation under blood flow conditions.

Keywords

platelet, albumin polymer, GPIb, GPIa/IIa, confocal microscopy

1. 緒言

血小板は、血管壁の損傷部位に集積して一次止血栓の形成に重要な役割を果たす。様々な疾患、病態で血小板の量的減少、質的障害に基づく出血傾向が報告されている。¹⁾ 血小板の量的、機能的障害による失血を防ぐために、医療現場ではしばしば血小板輸血が施行される。他人の血液由来の血小板を輸血成分として用いる限り、肝炎、AIDSなどの致死的なウイルス感染の危険を完全に回避することはできない。感染リスクのない人工物を用いて止血機能を回復することができれば医療上の利益は大きい。止血機能を回復させる人工血小板として現在までに様々な人工物が検討された。²⁻¹⁰⁾ 体内に安全に投与できる物質を担体として用いなければ臨床応用はできない。そこで、血漿蛋白として元々生体内に存在するアルブミンを担体として用いれば安全性の問題が比較的少ないと考えられた。⁶⁾

血小板は、1) 血管壁損傷部位への粘着、凝集による直接的止血栓の形成、¹¹⁾ 2) フィブリノーゲン、von Willebrand因子(VWF)などの凝固促進蛋白の放出、¹²⁾ 3) 凝固に必要なリン脂質の供給、¹³⁾ 4) microparticleの放出、¹³⁾ その他さまざまな機能を介して止血と血栓形成に関与する。¹²⁾ われわれは、血管壁損傷部位における粘着、凝集による直接的止血栓の形成を補助する人工物の作成を目指した。担体としてはアルブミン重合体を用いた。血管壁の損傷により血流に曝露されるマトリックス、マトリックスと結合する血漿リガンド蛋白、あるいは血小板血栓に結合する機能を保持させるために、代表的な血管内皮下マトリックスであるコラーゲンと結合するGPIa/IIa、コラーゲンと結合する血漿蛋白であるVWFと結合するGPIbをアルブミン重合体に結合させた。^{3, 4, 14)} 血小板は血流の存在下で血管壁の損傷部位に結合して粘着、凝集することにより止血に関与するため、^{11, 14)} flow chamberを用いた人工的な血流条件下におけるマトリックス表面上への血小板血栓を指標としてアルブミン重合体の血栓形成補助効果を検討した。血小板は単に血管壁の損傷部位に粘着するのみでなく、血小板同士が結合して3次的に血小板血栓を成長させることにより血流のうっ滞を惹起させ凝固血栓の形成を容易にする作用もある。¹⁵⁾ 高さ成分も含めた血小板血栓の3次的成長におよぼす人工血小板の効果を検討するために高速レーザー共焦点顕微鏡によるイメージング法を用いた。¹⁶⁾

2. 方法

1) アルブミン重合体の作成、血液サンプルの準備

recombinant GPIa/IIa (rGPIa/IIa), recombinant GPIb

(rGPIb) 結合アルブミン重合体の作成法は既に報告した。^{3, 5)} 作成に当たってはアルブミン重合体の分子径が1000nmとなるように重合度を調整した。^{3, 5)}

健康成人より血液を採取した。採取した血液は選択的抗トロンピン薬であるアルガトロバン (Mitsubishi Chemical Corp; Tokyo Japan, 終濃度 $100 \mu\text{M}$) にて抗凝固処理した。血液中の血小板数を減少させ、血小板減少症モデル血液サンプルを作成するために、 $100 \times g$ 、15分間の遠心にて多血小板血漿を分離した。多血小板血漿を取り除いたのちの、赤血球を含む血液細胞分画を $1,500 \times g$ にて10分間遠心した。血漿と赤血球成分の中間に集積した、血小板と白血球よりなる白色部分 (buffy coat) を取り除き赤血球成分を分離した。

多血小板血漿をさらに $1,500 \times g$ にて10分間遠心し血小板を取り除き乏血小板血漿を作成した。前節の方法で分離した赤血球成分と、乏血小板血漿を混合して再構成血液を作成した。再構成血液は主に赤血球と血漿よりなる。再構成血液中の血小板数は $10,000/\mu\text{L}$ 以下であることを粒子計測法にて確認した。再構成血液にメパクリン (quinacrin dihydrochloride; Sigma, St Louis, MO, 終濃度 $10 \mu\text{M}$) を添加し、血小板を蛍光標識した。

2) Flow Chamberによる血小板血栓の評価

牛アキレス腱由来のI型コラーゲン (Sigma, St Louis, MO) をガラス板上に固相化した。乾燥させたのち平行平板flow chamberに組み込んだ。方法の詳細は既に報告した。^{17, 18)} メパクリンにて蛍光標識した血小板を含む全血をシリンジポンプ (model 935; Harvard Apparatus, South Natick, MA) を用いて、 116.1 ml/hr の速度にてflow chamber内に灌流した。流路の幅が連続的に変化するUsami式のGascketを用いることにより、flow chamber内における観察位置を変化させるだけで血流量を変化させることなく異なる壁すり速度の条件における血栓形成の評価が可能である。¹⁹⁾ コラーゲン上の血小板血栓の形成とその2次的成長を倒立蛍光顕微鏡 (DM IRB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH) にて連続的に観察した。蛍光顕微鏡による画像をCCDカメラ (L-600, Leica) によりデジタル変換しデジタルビデオレコーダー (SVO-1500, SONY) に記録した。画像をパーソナルコンピューター (PowerBook G4, Machintosh, USA) に取り込み、NIH Image 1.63 (シェアウェア) を用いて解析した。

3) 高速レーザー共焦点顕微鏡イメージングシステムを

用いた血小板血栓の3次元構造の解析

高速レーザー共焦点顕微鏡を用いて血小板血栓の3次元形態評価を行った (Fig. 1). 方法の詳細は既に報告した.¹⁶⁾ 略記すると, 20,000のピンホールを有する円盤を高速回転させ共焦点ユニット (CSU 10高速タイプ, 横河電機) と画像増強システム (SRUB GEN III+, Solamer, インターメディカル) を用いることによりビデオレートでの共焦点画像の撮影を可能とした. ピエゾモーターユニットを用いて対物レンズを2 μm /秒の一定速度で上下させ底面から上面までの血栓の断層イメージを連続的に記録した. 血栓の成長過程で観察部位を一カ所に固定することにより, 血小板血栓の3次元成長におよぼすアルブミン重合体の効果を検討することが可能となった. 血小板血栓の断層像を重ね合わせて3次元投影像を再構成した.

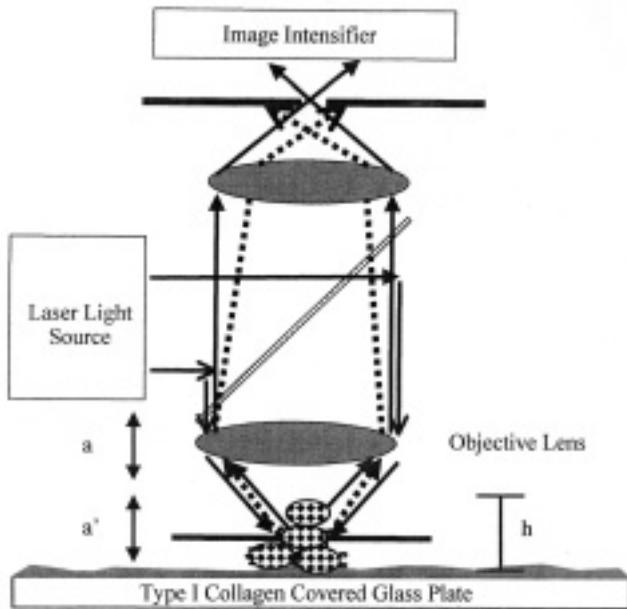


Fig. 1. Three-Dimensional Imaging of Platelet Thrombi by Ultra-Fast Laser Confocal Microscopy. Objective lens was moved up and down at a constant speed of 2 μm /second by piezo-electric motor control unit to obtain scanning images of platelet thrombi from the bottom to the top. Then, the scanning confocal images were projected from the top to the bottom at every 10 degrees to obtain three-dimensional projection images. The projection image from the top, which demonstrated two-dimensional surface area coverage by platelet, and the image from the side, which demonstrated the height of thrombi, were shown in Figure 5.

3. 結果

1) 血小板血栓の2次元成長におよぼすアルブミン重合体の効果

単位時間の血液灌流によりコラーゲン表面に形成される血栓は, 血液中の血小板数を減少させることにより著減した (Fig. 2). 結合した血小板膜蛋白の種類, 有無にかかわらず, また, 壁すり速度の高低にかかわらずアルブミン重合体は単位時間の血液灌流による血小板血栓の形成を促進させた (Fig. 3, Fig. 4).

血栓形成促進効果は, アルブミン重合体に結合した血小板膜蛋白の種類, 有無により大きな影響を受けた. すなわち, 1,500 s^{-1} の壁すり速度の条件では, コラーゲン受容体であるrGPIa/IIa, VWF受容体であるrGPIb を結合させたアルブミン重合体を含む血液灌流後の血小板によるコラーゲン占有率は, これらの蛋白と結合しないアルブミン重合体を含む血液灌流後の1.4倍に達した (Fig. 3). 100 s^{-1} の壁すり速度の条件でも, rGPIb, rGPIa/IIaを結合させたアルブミン重合体の血栓増強効果が, こ

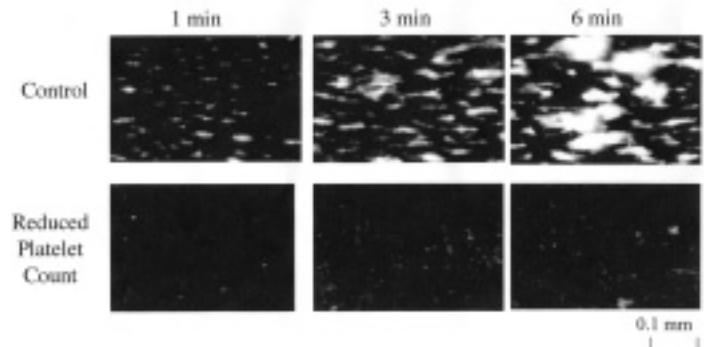


Fig. 2. Two-Dimensional Growth of Platelet Thrombi on the Surface of Collagen in the Presence of Normal and Reduced Platelet Count.

Platelets (white particles) adhered and made thrombi on the surface of collagen under blood flow condition in the presence of blood obtained from healthy donor having platelet count 300,000/ μl . On the other, only few platelets adhesion, without thrombus growth, could be detected when blood with reduced platelet count (less than 10,000/ μl) was perfused.

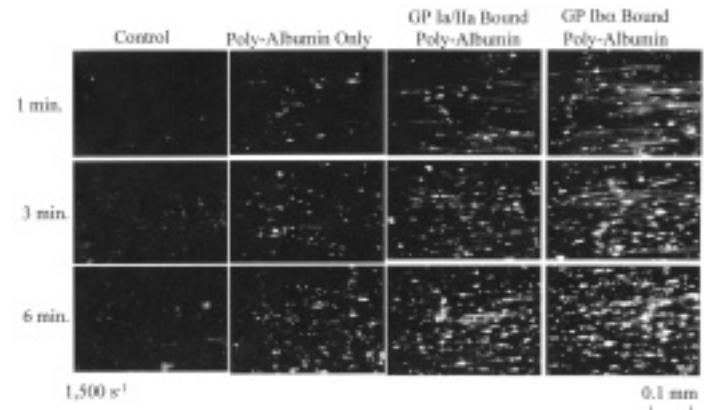


Fig. 3. Effects of Albumin Polymer Bound with Various Platelet Membrane Receptor Proteins on the Two-Dimensional Growth of Platelet Thrombi Formed on the Surface of Collagen at a Wall Shear Rate of 1,500 s^{-1} .

Twenty ml of Blood samples with reduced platelet count was mixed with the 400 μl PBS solution (pH 7.4) containing or not containing various fluorescinated albumin polymers at a concentration of 10 mg/ml. Then, the blood specimens were perfused on the surface of collagen at a wall shear rate of 1,500 s^{-1} for 6 minutes. Albumin polymers, especially those bound with rGPIb enhanced two-dimensional growth of platelet thrombi.

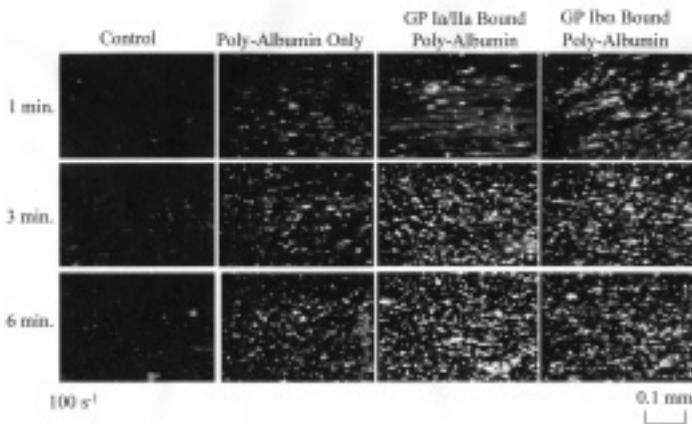


Fig. 4. Effects of Albumin Polymer Bound with Various Platelet Membrane Receptor Proteins on the Two-Dimensional Growth of Platelet Thrombi Formed on the Surface of Collagen at a Wall Shear Rate of 100 s^{-1} .

The experiments were performed in a similar manner as described in the legend for Fig. 3 with only difference in the perfusion wall shear rate of 100 s^{-1} . Albumin polymers, no matter whether they bound with platelet receptors or not, enhanced two-dimensional growth of platelet thrombi. Albumin polymers, bound with rGPIa/IIa rather than those bound with rGPIb, showed strongest enhancing effects on the two-dimensional growth of platelet thrombi.

これらの蛋白と結合しないアルブミン重合体の効果を上回った。しかし、その差は小さく、rGPIa/IIa, rGPIb を結合させたアルブミン重合体を含む血液灌流後の血小板によるコラーゲン占有率は、これらの蛋白と結合しないアルブミン重合体を含む血液灌流後のそれぞれ1.2倍, 1.4倍であった (Fig. 4)。

2) 血小板血栓の3次元成長におよぼすアルブミン重合体の効果

高速レーザー共焦点顕微鏡を用いることにより血小板血栓の3次元投影像を作成した。血小板数を減少させた再構成血液を灌流した場合には単層の血小板の接着が見られるのみであった。アルブミン重合体の存在下で血液を6分間灌流したのちに形成された血小板血栓の3次元投影像をFig. 5に示した。1,500 s^{-1} の条件では、血栓の直上からの投影像(血栓の2次元成長を示す)ではサイズに差を認めない場合であっても、rGPIb を結合させたアルブミン重合体の存在下で血液を灌流した時に形成された血栓では、側法からの投影により観察される血栓の高さがより高く見える場合があった。100 s^{-1} の条件でも、rGPIa/IIa, rGPIb を結合させたアルブミン重合体の存在下で形成された血栓は、3次元成長により速く成長する傾向を認めた。1,500 s^{-1} 同様rGPIb を結合したアルブミン重合体の存在下の血栓がより3次元成長により高さの高い血栓となる傾向であった。

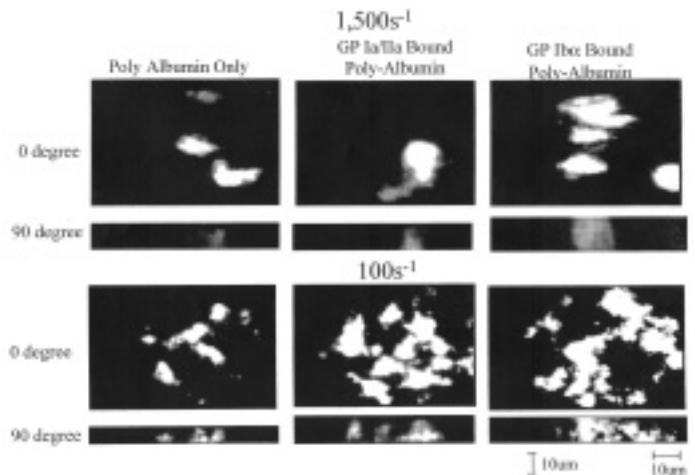


Fig. 5. Effects of Albumin Polymer Bound with Various Platelet Membrane Receptor Proteins on the Three-Dimensional Growth of Platelet Thrombi Formed on the Surface of Collagen.

The experiments were performed in a similar manner as described in the legend for Fig. 3 and Fig. 4. The enhancing effects of albumin polymer on the three-dimensional growth of platelet thrombi were detected by newly developed laser confocal microscopic imaging system. The 0 degree demonstrated the projection images from the top of thrombi, while 90 degree demonstrated the projection images from the side of the thrombi. At the shear rate of $1,500 \text{ s}^{-1}$, three-dimensional size of platelet thrombi, especially the height of thrombi, was enhanced by the presence of albumin polymer bound with rGPIb.

4. 考察

血小板減少症症例に投与して止血機能を回復させる人工物としてアルブミン重合体の性質を検討した。止血における血小板の性質として、1) 血管壁の損傷部位に結合する(粘着)、2) 血小板同士が結合する(凝集)、ことが重要であるとされる。実際に、血管壁が損傷され、血流に曝露されたコラーゲンなどの血管内皮下血栓性マトリックスに血小板が粘着し、局所で凝集することにより止血が始まる。これらの反応は血流の存在下で惹起される。そこで、代表的な血管内皮下マトリックスであるコラーゲンを固相化したガラス板上に、血液を灌流して惹起される血小板血栓を指標としてアルブミン重合体の止血補助機能を検討した。血小板数を減少させた血液にアルブミン重合体を加えるとコラーゲン表面の血小板血栓の形成は促進された。コラーゲン受容体、VWF受容体を結合させたアルブミン重合体は顕著な血小板血栓増強効果を呈した。特に、高ずり速度下ではVWF受容体であるrGPIb を結合させたアルブミン重合体による血小板血栓の2次元、3次元成長促進効果が顕著であった。これらの血小板膜糖蛋白と結合しない単独のアルブミン重合体も血栓形成を補助する効果を示した。コラーゲン表面、血小板へのアルブミン重合体の非特異的結合が血栓形成促進効果の原因と推察される。

コラーゲン受容体としてはGPVIとGPIa/IIaが知られる。GPVIは血小板を活性化させるシグナル蛋白としてnative血小

板の血栓形成に關与する。¹⁷⁾一方, GPIa/IIaは直接コラーゲンに結合して血栓の成長を補助する効果を呈するが, その有効性は比較的壁ずり速度の低い条件に限られると理解されていた。²⁰⁾われわれの実験結果も, rGPIb 結合アルブミン重合体は高ずり応力下の血栓形成を, rGPIa/IIa結合アルブミン重合体は比較的低ずり応力下の血小板血栓の形成を促進させる効果を有することを示唆した。血小板減少症の症例に対して投与した時に, 高ずり速度下の血管内径が狭く血流のずり速度が大きい小血管での止血にはGPIb と結合したアルブミン重合体が, 比較的太く血流の遅い血管における一次止血にはGPIa/IIa結合アルブミン重合体が人工血小板として有効に作用する可能性を示唆した。

5 . 結論

血小板膜糖タンパク受容体を結合させたアルブミン重合体は, 血小板の減少した条件において止血機能を増強させる人工血小板として機能し得る可能性が示唆された。

謝辞

本研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金(高度先端医療研究事業)「人工血小板開発研究」, 厚生労働省科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)「認識部位担持リボソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価」, 東海大学総合研究機構 研究症例補助金(2003), 神奈川科学技術アカデミー平成15年度研究助成第一段階の援助、文部科学省科学研究費補助金(15590771), 東海大学医学部プロジェクト研究助成(平成16年度)によった。

参考文献

1. Ohmori T, Yatomi Y. [Platelet disorders]. *Rinsho Byori*. 2002;Suppl 123:112-9.
2. Collier BS, Kutok JL, Scudder LE, Galanakis DK, West SM, Rudomen GS, Springer KT. Studies of activated GPIIb/IIIa receptors on the luminal surface of adherent platelets. Paradoxical loss of luminal receptors when platelets adhere to high density fibrinogen. *J Clin Invest*. 1993;92:2796-806.
3. Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, Ikeda Y, Tsuchida E. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib alpha to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules*. 2000;1:290-5.
4. Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y. Rolling properties of rGPIIb/IIIa-conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296:765-70.
5. Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, Tsuchiyama H, Narumi H, Kainoh M, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E. Hemostatic effects of polymerized albumin particles

- bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306:256-60.
6. Levi M, Friederich PW, Middleton S, de Groot PG, Wu YP, Harris R, Biemond BJ, Heijnen HF, Levin J, ten Cate JW. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med*. 1999;5:107-11.
7. Lambert CJ, Marengo-Rowe AJ, Leveson JE, Green RH, Thiele JP, Geisler GF, Adam M, Mitchel BF. The treatment of postperfusion bleeding using epsilon-aminocaproic acid, cryoprecipitate, fresh-frozen plasma, and protamine sulfate. *Ann Thorac Surg*. 1979;28:440-4.
8. Goodnough LT, Kuter D, McCullough J, Brecher ME. Apheresis platelets: emerging issues related to donor platelet count, apheresis platelet yield, and platelet transfusion dose. *J Clin Apheresis*. 1998;13:114-9.
9. Rybak ME, Renzulli LA. A liposome based platelet substitute, the plateletsome, with hemostatic efficacy. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*. 1993;21:101-18.
10. Kitaguchi T, Murata M, Iijima K, Kamide K, Imagawa T, Ikeda Y. Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Iba1: a potential substitute for platelet transfusion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261:784-9.
11. Goto S. Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effect of new antiplatelet agents. *Current Vascular Pharmacology*. 2003;2:23-32.
12. Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem*. 2000;46:1260-9.
13. Goto S, Tamura N, Li M, Handa M, Ikeda Y, Handa S, Ruggeri ZM. Different effects of various anti-GPIIb-IIIa agents on shear-induced platelet activation and expression of procoagulant activity. *J Thromb Haemost*. 2003;1:2022-30.
14. Goto S. Role of von Willebrand factor for the onset of arterial thrombosis. *Clin Lab*. 2001;47:327-34.
15. Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest*. 1998;101:479-86.
16. Goto S, Tamura N, and Ishida H. Ability of Anti-GPIIb/IIIa Agents to Dissolve Platelet Thrombi Formed on a Collagen Surface under Blood Flow Conditions. *J Am Coll Cardiol*. 2004;in press.
17. Goto S, Tamura N, Handa S, Arai M, Kodama K, Takayama H. Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand

- factor surfaces under flow conditions. *Circulation*. 2002;106:266-72.
18. Goto S, Tamura N, Eto K, Ikeda Y, Handa S. Functional significance of adenosine 5'-diphosphate receptor (P2Y₁₂) in platelet activation initiated by binding of von Willebrand factor to platelet GP I_bα induced by conditions of high shear rate. *Circulation*. 2002;105:2531-6.
19. Usami S, Chen HH, Zhao Y, Chien S, Skalak R. Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Ann Biomed Eng*. 1993;21:77-83.
20. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not α₂β₁ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J*. 2001;20:2120-30.

冠動脈バイパスグラフト手術患者における輸血低減のための術中自己血投与補助としての酸素運搬体の使用

Use of an Oxygen Therapeutic as an Adjunct to Intraoperative Autologous Donation to Reduce Transfusion Requirements in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery

A Gerson Greenberg, MD, PhD, FACS, Hae W Kim, PhD, the Hemolink Study Group
Department of Surgery, The Miriam Hospital, Providence, RI 02906, USA

(訳者) 山本 学*・渡辺真純・小林紘一

Manabu Yamamoto, Masazumi Watanabe, Koichi Kobayashi

訳者のコメント

現在開発が進められている修飾Hemoglobin (Hb)のうち主なものとしては、北米企業による

1. glutaraldehyde重合ヒトHb (PolyHeme™, Northfield社)
2. glutaraldehyde重合ウシHb (Hemopure™, Biopure社)
3. o-raffinose重合ヒトHb (Hemolink™, Hemosol社)

が挙げられる。いずれもさかんに臨床試験が行われており、その成績が報告されてきている。今回はそのうちHemolinkについて、今年Journal of the American College of Surgeons誌に発表されたPhase studyの成績を紹介したい。

Hemolinkは、三糖類のo-raffinoseを酸化して開環し、アルデヒド体とし、これを架橋剤としてヒトHb分子の表面リジン残基と反応させて分子量を大きくしたHb重合体である。尚、本文のあとに後記を付けたので一読して頂きたい。

緒言

冠動脈バイパスグラフト術(CABG)は、北米、西欧で一般的に行われている外科手術のひとつであり、米国では年間約60万例にのぼる。CABGによって生命予後は延長、改善されている。通常CABGは人工心肺の補助のもとに行われているが、それは外科手術における総輸血量のかなりの部分を消費しており、心臓外科手術で全貯蔵血の10~20%を消費していると見積もられている。不足した資源の供給により、同種血、血液製剤の使用が減少すれば、それに伴う感染症、免疫反応へのriskも

減少し、社会的利益を生む。

Intraoperative Autologous Donation (IAD: 術中の自己血輸血、手術開始時に自己血液を採取し、必要時に返血する。)は、中等度の出血が予想される外科手術患者の、同種血輸血への曝露を減らすという考えのもと導入された。IADは、患者自身の新鮮な全血を使用可能にする。新鮮な自己血は質が高く、酸素運搬能も保たれており、赤血球の寿命も通常通り、血小板も含まれており凝固能にも問題がない。IADでは輸血に伴う血液検査も不要であり、非常に魅力的である。

IADは人工心肺を用いた心臓外科手術に適している。人工心肺はヘパリンによる抗凝固を必要とし、その結果出血量が増大し、血液の人工心肺の回路への曝露により血小板の消費や白血球の活性化、赤血球の溶血といった有害反応が起こる。人工心肺導入前に患者より採取された血液は、その回路に曝露されおらず、返血時にもその凝固能や他の機能は保たれている。

IADは有用であると証明されてはいるが、広く実用化には至っていない。その理由のひとつに、この技術を用いた際にもたらされる貧血に対する懸念が挙げられる。血液採取、それを補う輸液によって、酸素運搬能はかなり低下する。心機能に障害があり、血管病変を伴っていることが多く、状態の良くない心臓外科の患者においてそれは重大なことである。人工心肺の間、安全なHb濃度、酸素運搬能を保ちつつ、IADによって得られる血液量を増やし、その適応を拡大することは望ましいことである。

Hemolink (Hb raffimer; Hemosol Inc.) のような酸素運搬能

*慶應義塾大学医学部呼吸器外科 〒160-8582 新宿区信濃町35, Department of Thoracic Surgery, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan
論文受付 2004年4月13日 受理日 2004年4月22日

をもつ輸液が、膠質、晶質の代わりに使用され、術中の自己血液の採取が促されれば、IADをより多くの患者に適応することができる。Hb raffimerはHbを基にした酸素運搬体である。この酸素運搬体は、人工心肺導入前により多くのIADの血液採取を可能としながらも、心臓、他の組織に十分な酸素を供給する。動物のCABGモデルでは、膠質を投与した群に比し、Hb raffimer投与群では、同種血を必要としたcaseが少なかったとの研究報告がある。Phase study (C-HLK-101-SAF-CP312)では、Hb raffimerの投与で、血圧の一過性上昇、腹痛、嚔下障害、若干の酵素上昇を認めしたが、大きな問題には至らなかった。二つのPhase study (C-HLK-203-CVS, Protocol204)では、CABG手術患者にIAD促進のため1000mlまでのHb raffimerが投与され、術中そして術後早期に高い総Hb濃度を維持した。Starch溶液の対照と比較し、Hb raffimerは安全で、同種血の輸血を減らすということが明らかとなった。

今回のこの試験では、CABG手術患者において、IADと組み合わせたHb raffimer投与の効果、同種血、血液製剤の使用に関して、starch対照群と比較する。

方法

HLK-302study

初回CABG手術患者における、IADと組み合わせて投与された際の、Hb raffimer、対照として10%pentastarchの、効果、安全性を評価するための多施設、無作為二重盲検のphase clinical trialである。インフォームドコンセント取得後、299人の患者が無作為化され、人工心肺開始時に自己血を500ml~1500ml採取後、750mlのHb raffimerあるいは750mlのpentastarchを投与した。採取する血液の総量は、公式に基づきHb濃度7g/dlを目標として計算された。もし輸血が必要となった場合、患者はまずIADによる赤血球輸血を受ける。さらに必要になれば同種血が投与された。輸血はプロトコールに則って行われた。赤血球以外の血液製剤にはプロトコールはなかった。

患者は、入院期間中の赤血球および他の血液製剤の投与回避、投与量に関して評価された。副作用、末梢血、生化学、尿分析、血液ガス、バイタルサイン、そして抗hemolink抗体についても評価された。

抗hemolink抗体

この臨床試験の患者の血清はHb raffimer投与前後につき、ELISA法にて抗Hb raffimer IgG、IgM活性が測定された。投与されていない人々の平均から+3SDまでは陰性と判断された。陽性のものはSepharose4B吸収法により確認され、ELISA法により再検された。

臨床検査の阻害作用

Hb raffimerの存在は、Hbの吸光スペクトルの特徴により、臨床検査結果を阻害する可能性がある。この試験の分析を行う全ての検査室において、全てに適確な補正がなされた。阻害作

用は血清酵素、ビリルビン、総タンパク、アルブミンに認められた。他は補正を必要としなかった。

Historic controls

ミリアム病院は、プロビデンスにある247床の非営利の病院である。年間約700人が心臓外科の手術を受け、そのほとんどがCABGである。比較を目的として、Hb raffimer群(HR群)、対照群と同様な人数で一連の、人工心肺を伴うCABG初回手術の患者150人が病院のデータベースより選ばれた。この病院では、血液、血液製剤は標準的な臨床判断に基づき投与されている。

結果

被験者統計

386人の患者がこの試験に登録された。このうち45人はスクリーニングで不適と判断され、無作為化されなかった。残る341人のうち169人がHR群、172人が対照群となった。このうち37人は無作為化されたものの投与を受ける前に中止となった。これらの人々は両群に均等に存在した。無作為化されるも5人が導入後に中止となり、残る299人が調査された。148人がHR群、151人が対照群。3人が術後に死亡、残る296人が調査を終えた。147人がHR群(1人死亡)、149人が対照群(2人死亡)であった。

患者の平均年齢は61.5歳、body mass indexは28.1。両群に有意差はなし。Historic groupよりの150人も、年齢、性において調査群と同様であった。

効果

HR群では、56%の患者が同種血輸血を受けた。対照群では76.2%、historic control群では95%であった。投与された赤血球総量はHR群で49単位、対照群で104単位、historic control群で480単位だった。

赤血球以外の血液製剤の投与は、HR群で21.6%、対照群で22.5%、historic control群で50%であった。これらの輸血総量はそれぞれ、150、238、270単位であった。

安全性

この試験の副作用はCOSTART辞書第五版を用いてコードされた。HR群の重大な副作用は全ての臓器にわたり、対照群と同様のものであった。299人のうち3人が死亡した。1人はHR群(多臓器不全)、2人は対照群(低血圧、脳梗塞)。副作用による試験からの脱落はなかった。

この試験の患者全てに少なくとも一つの副作用があった。副作用の総数は、HR群が対照群より10%以上多かった。報告された全ての副作用のうちHR群の4.3%、対照群の3.3%が重大な副作用であると評価された。HR群で顕著に発生が多かったのは、高血圧、高ビリルビン血症、アミラーゼ上昇、泌尿器系の副作用であった。

高血圧はHR群(65.5%)で対照群(35.8%)より多かった。この一過性の高血圧は β -blocker、Ca-blockerによりコントロ

ール可能であった。心筋梗塞が14人の患者にみられた。9人(6.1%)がHR群, 5人(3.3%)が対照群。この差は統計学的には有意ではなかった。CK-MB, troponin Iの上昇は両群において同様であった(それぞれ21.6%, 17.9%)。心筋虚血, 心電図上の虚血性変化(ST上昇, ST低下, 逆T)は両群において同様の頻度であった(HR群12.8%, 対照群11.3%)。

消化器の副作用で最も多かったのは, 嘔気, 嘔吐であった。これらは全身麻酔からの回復時に一般的に認められるものであり, 両群とも同様の頻度であった。phase studyで認められた腹痛, 腹部不快感は今回はみられなかった。これは疼痛管理によるものと考えられる。

一過性黄疸, 高ビリルビン血症, あるいは両方は対照群(1.3%)よりHR群(36.5%)に多く認めた。これはHb raffimer投与によるポルフィリンの代謝によるものである。ビリルビンの上昇は肝障害との関連はなく, 平均の γ -GTPは正常であった。

膵酵素の上昇もHR群でより多く認めた。HR群では148人中33人(22.3%), 対照群では151人中20人(13.2%)にアマラーゼの上昇を認めた。HR群で1人の患者に膵炎を認めたが, 慢性に移行せず寛解した。CABGの患者に, 原因不明の膵炎が3%ほど合併するとの報告がある。

泌尿器系の副作用の発生もHR群(31.1%)の方が対照群(14.6%)より多かった。

血尿等尿の異常も, HR群にて多く報告されている。HR群のこれらの報告の大部分は, 尿中へのHb raffimerの少量の排泄によると考えられる, 尿の変色の様々な記載である。4例の腎不全の報告があった。2例はHR群, 2例は対照群。6例の脳血管障害の報告があった。それぞれ3例。2%という発生率は以前に報告されたCABGにおける脳血管障害の発生率と一致している。

感染はHR群で21例(14.2%), 対照群で24例(15.9%)であった。HR群の4例, 対照群の3例は重いものであった。30例の再入院があった。11例はHR群, 19例は対照群であった。

Hb raffimerに対する試験前の免疫反応は1%。投与後のHRに対する抗体活性は, HR投与患者139人中26人(18.7%)で高値であった。対照群では142人中2人(1.4%)で免疫反応が高く, これは試験前と同様であった。

論考

IADの効果を評価するため, この試験では, IADが通常的には施行されていない病院の輸血に関する統計と比較した。この比較は, IAD単独, あるいは酸素運搬体との組み合わせが, 標準的臨床成績と比較し, 同種血輸血の減少に寄与しているかを決定するものである。750mlという量は, CABG手術におけるIADを用いた以前の臨床試験をもとにしている。

historic control群, 対照群と比較して, IADと組み合わせた人工酸素運搬体投与は, CABG周術期において輸血の需要の減少につながることを結果は示している。historic control群に比し39%, 対照群に比し20.2%の輸血の減少があった。赤血球投

与単位数にも違いを認めた。多い方ではhistoric control群の150人で480単位(1人あたり3.2単位), 少ない方ではHR群の148人で49単位(1人あたり0.3単位)であった。

赤血球以外の血液製剤の使用量, 使用頻度においてもHR群で少なかった。historic control群では50%, HR群では21.6%であった。その量は, HR群で最も少なく148人で150単位, 対照群では151人で238単位, historic control群では最も多く150人で270単位であった。

これらの結果は, 中等度の出血を伴う外科手術においてHb raffimer投与が, IADの利点を増大させるという仮説を支持するものである。同種血輸血に伴う危険への暴露は減少し, 全体の血液の供給に対する需要も減少する。大きなriskもなく安全であった。これらの事実は, riskとbenefitのバランスからみても好ましいということを示し, 理論的にも支持する。また同種血輸血, 血液製剤の使用の回避, 減少により全体のコストも減少する可能性がある。

IADは, 更なるインフラ, 周術期の計画を必要としない。そして術中輸血に迅速に対応可能な, 患者自身の全血の十分な供給ができる唯一の手段である。更に, 酸素運搬体投与を伴うIADの使用は, 人工心肺導入中の血管内Hb濃度を上げ, 臓器への血流を改善し, 術中の赤血球喪失量を減らし, 同種血輸血にたよる前に, より大きな出血にも耐えることを可能にする。

死亡は, CABGにおいて重大なリスクである。1%程から, リスクの高い患者では10%以上と見積られる。この試験では3例の死亡があった。HR群148例中1例, 対照群151人中2人である。この試験における死亡率は約1%, これは予期される範囲内のものである。

副作用の数では, いくつかの臓器ごとの副作用の分布に注目すべき違いは認められ, 両群同様であった。対照群に比較して, HR群における血圧上昇の発生頻度の増加, 黄疸, ビリルビン上昇などのようなこれらの違いの多くは, Hb raffimerの特性に基づいたものによると説明され得る。

HR群ではビリルビン値は予想されたように上昇したが, 対照群ではそうではなかった。この上昇は, 溶血のあとに見られるような, 直接, 間接ビリルビン両方の上昇からなっていた。これは予想されることで, 網内系によるHbの代謝排泄は, ポルフィリンのビリルビンへの転換を含むからである。

黄疸は, ほとんどHR群の患者にだけ起こった。これは, 通常の分解経路への大量のポルフィリン負荷による通常の代謝の結果と考えられる。黄疸の発生はこのクラスの生成物においては共通の所見で, 心臓手術での他のHb由来の酸素運搬体使用でも報告があった。それはHb raffimerを投与された患者の約40%に起こり, 程度は軽く, 一過性で, 一般的に1日から3日続き, 血清ビリルビンの上昇を伴う。他の肝機能を示す検査においては臨床的に有意な変化はなく, 肝機能障害を示すものではない。

血圧の上昇は, CABG術後の患者においては一般的な所見で, 15%~60%との報告がある。多くの原因, 疼痛, 低酸素, 低換気, 低体温, 麻酔深度が浅い, などが一因となっているかもし

れない。血漿中の遊離Hbに関係する知られた効果の一つとして、血管収縮作用があり、動物、ヒトにおいて高血圧を引き起こすことが示されている。正確な機序はまだ解明されていないが、その効果は部分的には、遊離Hbが血管内皮のNOと結合するという性質の結果、血管収縮に至るためと考えられている。この効果はしばしばNO scavengingと呼ばれ、NOの量を減じ、血管収縮へと至らしめ、血圧が上昇する。しかしこのNO結合だけで全ての血管収縮効果が説明できるとは考えにくい。endothelin放出の増加、あるいはアドレナリンレセプターを介した血管の収縮調節の結果によるものかもしれないという報告もある。

この試験では、報告された平均血圧上昇の発生率はHR群(66%)の方が、対照群(36%)よりも高く、以前の報告と一致している。この試験、そしてphase trialにおいて、平均血圧の上昇は5~15%の範囲だった。この試験でみられた血圧の上昇は、以前報告されたデータとも一致し、プロトコルによる積極的介入にて β -blocker、Ca-blockerの使用頻度が増加したことに関係している。

CABGの手術において、血圧のコントロールに最も一般的に使用される薬剤は、ニトログリセリンとニトロプルシドナトリウムである。これらの薬剤はNOのドナーであり、血管抵抗を減じ、血圧を下げる。この試験において、肺血管抵抗の評価はなされていないが、何人かの患者において、Hb raffimer投与後、望ましい血圧を得るために投与されたニトログリセリンとニトロプルシドナトリウムの量が通常より多くを必要とした。この血管拡張剤投与量の増加は、多分に、よく知られたHb、ここではHb raffimerのNO scavenging効果によるものであろう。HbはNOに対して非常に高い親和性を持ち、酸素、そして一酸化炭素に対する親和性よりも高い。血圧コントロールのための血管拡張のために他の薬剤を用いた違うアプローチが必要となった患者もいる。このようなケースで最も投与されたのは、 β -blocker、Ca-blockerで、次いでACE inhibitor、平滑筋弛緩のためのhydrazineであった。もし、Hb raffimerのような合成物の昇圧作用が、実際に、部分的にはendothelinの放出を介するものであるのなら、 β -blocker、Ca-blockerの投与は、そのendothelin放出、合成の抑制という作用よりみると、妥当であると考えられる。

この多施設の試験において、アミラーゼおよびリパーゼを臓器傷害の指標としてモニターした。アミラーゼの軽度の上昇は両群に認められた。上昇は両群とも同程度、一過性で、術後72時間で回復している。これらの上昇は全て、正常値上限以下のものであった。

HR群におけるリパーゼ値上昇は、より高頻度に起こる。その患者の大多数においては、アミラーゼの上昇も伴っている。上昇は一過性で、術後72時間後までに回復する。一人の患者では、これらの酵素レベルの変化は消化器症状、徴候を伴い、急性膵炎として矛盾しなかった。

HR投与患者の、アミラーゼそして時にリパーゼの上昇の機序は、まだわかっていない。注意すべきは、高アミラーゼ血症、

高リパーゼ血症があるからといって、膵炎という診断が下るわけではないということである。むしろそれらは、膵炎の臨床所見が存在するときに確認するというパラメーターである。アミラーゼそしてリパーゼの上昇は、人工心肺を用いる心臓手術を含む大きな外科手術において、一般的に起こることであり、膵炎の臨床的所見もなく1000単位以上も上昇する人がいる。

今までHb-baseの酸素運搬体投与後の腎障害に関心が持たれていたが、Hbを精製し、架橋により安定させることによって、動物、臨床試験において腎障害を認めなかった。CABG手術を受ける患者に急性腎不全が起こることは知られている。この試験では、両群で2人の腎障害の報告があった。対照群の1人は透析を必要とした。この試験のデータは、これらの手術に伴う腎障害の発生が、Hb raffimerの投与によって増加することはないということを示している。

前述のように、両群において3例の脳血管障害があり、全体の脳血管障害発生率は2%で、これは一般的なCABG手術における1~6%という発生率の範囲内である。人工心肺を用いた心臓手術での脳血管障害の原因は、しばしば塞栓であり、術中操作、cannulation時、あるいは人工心肺開始時の動脈硬化のある大動脈よりの塞栓である。対照群の一人の患者は、剖検時に脳循環中のアテローム塞栓が確認されている。この試験において、循環中のHb raffimerの存在が、脳血管障害の発生を増加させるということとはなかった。

ひとつの興味深い所見は、対照群(19人)の方が、HR群(11人)に比較し再入院率が高いということである。酸素運搬体投与で、虚血による臓器傷害が軽減したことが推測される。物質の非細胞という特性、低体温状況下でさえ、右方シフトした P_{50} は、凝血塊、あるいは顕著な血管収縮によって血流が減じている組織への酸素供給を可能にする。合理的な推測ではあるのだが、この試験では、この臨床状況において最も影響を受ける臓器、脳、心、腎への虚血による傷害の違いを検出することはできなかった。

これらの結果は、中等度の出血を伴う外科手術において、Hb raffimerはIADプログラムの利点を増大させ得るという仮説を支持している。個々において、同種血輸血に関連するriskにさらされることは減少し、全体の血液供給に対する需要も減る。大きなriskもなく安全である。この事実は、Hb raffimerのriskとbenefitの好ましいバランスを理論的に支持する。同種血、血液製剤使用の減少、回避によって全体のコストが減少するかもしれないという可能性をも支持する。

結論として、IADと組み合わせたHb raffimer投与は、CABG手術におけるIAD単独群あるいはhistoric control群と比較し、同種赤血球、血液製剤への暴露を減らす。そしてそれは、長期的に安全性を高める。

訳者後記

同種輸血の低減というこの試験の目的は十分に達成されている。また、それによって感染、免疫反応などのriskへの曝露は確実に減っており好ましいことである。ただ、臨床実用にはま

だ多くの問題を抱えていると思われる。

たとえば、この試験での輸血のプロトコールは、本文中には記されていないが、血中Hb濃度のみによるものである（例えば術中6.0g/dl以下）。Hb投与群とpentastarch投与群にて、輸血の判断基準がHb濃度のみでは、差がでるのが当然といえなくもない。また、高頻度の尿の変色などに対して、厳密に二重盲検が守られていたかということに関して、その方法を含め記載が必要であろう。

血圧上昇、黄疸、アミラーゼ上昇等の副作用が高頻度で起こることは、Hbの性質、代謝より予想できること、対照でも起

こること、と簡単には片付けられない問題を含んでいる。この試験での投与量は一律750mlと決められているが、さらに投与した場合、より重篤な副作用が起こる可能性は十分にあると思われる。ちなみに、リン脂質二重膜内包Hb（Hb小胞体）を用いた酸素運搬体では、まだ動物実験の段階ではあるが、このような副作用は報告されていない。

以上より、現時点ではriskとbenefitのバランスが良いと言い切れることは困難ではないか、と訳者は思う。

さらなる研究を望みたい。

編集後記

大変遅くなりましたが、12巻1号をお届けします。来る7月13日、14日には札幌北榆病院 川村明夫 先生により第11回日本血液代替物学会年次大会が開催されます。会告にプログラムが掲載できましたが、血液代替物を広くそして深く討論する構成になっておりますので、ぜひご参加ください。また、本号では、二つの酸素運搬体制剤の安全性と適用に関する論文が掲載され

ております。この例から学び活かさなければ成らないことが多くあると思います。欧米での臨床試験成績の論文を本誌で紹介し勉強し合って、本邦での臨床試験に備えることも重要です。その様な活発な投稿も期待します。

(武岡 真司)

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を集める。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こと。
 - 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
 - 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
 - 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では⁽²⁾,^(3,5),^(1,4,6)などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名・論文題名・誌名 西暦発行年; 巻数: 頁~頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名・題名・編集者名・書名・発行地: 発行書店, 年号; 頁~頁。の順

とする。

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

武岡真司(委員長), 池淵研二, 津田良夫, 仲井邦彦, 福島昭二, 堀之内宏之, 宮尾秀樹, 村田満, 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 研恒社

人工血液 vol.12(1) 2004年6月18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)5363-3493 FAX(03)5363-3499

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

TEL(03)5286-3217 FAX(03)3205-4740

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

TEL(03)3265-8961 FAX(03)3264-1995