

シンポジウム：重症病態と輸血へヘモグロビンほどのレベルに保つべきか

人工赤血球 (HbV) と酸素運搬機能および組織酸素代謝

至適 Hb レベルならびに人工赤血球の展望

杖下 隆哉, 寺嶋 克幸, 坂本 篤裕

日本医科大学付属病院麻酔科学教室

キーワード

Hemoglobin vesicle, Hemorrhagic shock

はじめに

20 世紀初頭, Landsteiner らによる ABO 式血液型の発見以来, 現在に至るまで輸血療法が研究され進歩してきた。特に 1980 年代から成分輸血が開始され, 現在に至るまで頻繁に使用されている。一方で, 多くの合併症の報告がなされてきた。合併症に対し様々な対策が施されてきたが, 根本的な解決には至っていない。輸血に関する報告を基に, 日本赤十字社が輸血療法の実施に関する指針及び血液製剤の使用指針を発表し, 改訂を重ねてきた。しかし輸血を開始する明確な基準は存在せず, 現在も議論がつきないところである。平行して人工酸素運搬体も 20 世紀半ばから盛んに行われてきた。我々は, 臨床応用の可能性が高い Hemoglobin Vesicle (HbV) の安全性及び効果についての研究に関わる機会を得た。輸血指針に関して文献的考察を加えた上で, HbV の安全性及び効果についての研究の報告をする。

輸血適応の現状

平成 17 年 9 月, 厚生労働省は「輸血療法の実施に関する指針」及び「血液製剤の使用指針」(改訂版)を通知した。表 1 に大まかな輸血基準を示す¹⁾。しかし, 厳密にこの基準に従っている医療従事者はいないであろう。実際, 輸血の適応を決定する場合には循環動態を注意深く観察し, 虚血性心疾患などの基礎疾患などにも注意を払う必要がある。

表 1 急性出血, 周術期における輸血基準 (RCC)

1. 外科的適応として Hb 値が 10g/dL を超える場合は不必要, 6g/dL 以下ではほぼ必須
2. 周術期は Hb 値が 7~8g/dL あれば十分な酸素供給が可能
「輸血療法の実施に関する指針」及び「血液製剤の使用指針」, 平成 17 年 9 月, 日本赤十字より

表 2 Indications for RBC transfusions

Parameter	Evidence base: Intra operatively and ICU/Postoperatively general ward		
Physiologic transfusion trigger			
Relative hypotension	Yes	Yes	Yes
Relative tachycardia	Yes	Yes	Yes
New ST segment depression > 0.1mV	Yes	Yes	Yes
New ST segment elevation > 0.2mV	Yes	Yes	Yes
New wall motion abnormality (TEE/TTE)	Yes	Yes	Not applicable
PVO ₂ (mmHg)	<25	<32	Not applicable
O ₂ extraction rate(%)	>50	>40	Not applicable
SVO ₂	<50	<60	Not applicable
Decrease in VO ₂ (%)	>10-50	>10	Not applicable
Hemoglobin based transfusion trigger			
In all patients	≤6g/dL	7 g/dL	7-8g/dL
In patients > 80 years		7-8g/dL	8-9g/dL
In patients with severe CAD or CHF		8 g/dL	8-9g/dL
In patients with SaO ₂ <90%		8-9g/dL	9 g/dL
With fever/hypermetabolism		7-8g/dL	8-9g/dL

(文献 2) より引用)

表 2 に最近の文献から輸血の基準を示す²⁾。この基準でもヘモグロビン値が 6 g/dL 以下の場合にはほぼ輸血は必須であるとなっている。しかし臨床報告などでは Hb 値が 6 g/dL 以下でも死亡率は変わらなかったとしている³⁾⁻⁵⁾。

逆に健常成人ボランティアを使用した研究で, isovolemic anemia (Hb 5-6g/dL) の状態で認知機能テストをしたところ, 有意に認知機能が障害されたという報告もある⁶⁾。これらのことから, Hb 値 6~7g/dL という値は現在において安全最下限値ではないかと思われる。また冠動脈疾患や脳循環障害のある患者ではやや高い Hb 値 8~10g/dL 前後に保つことが推奨されているが, 明確なエビデンスがなく現在も議論が絶えない。

表3 同種血輸血の問題点

- 極めて短い保存期間(3週間)
- 近未来における献血量の不足
- 血液交差試験の必要性
- Infections (HIVウイルス、肝炎ウイルス、未知のウイルスなど)
- Immunological reactions (GVHD、TRALI、異型輸血など)

輸血を取り巻く諸問題

表3に輸血の問題点を示す。保存期間に関しては、それまで保存期間が6週間であったが、エルシニア菌による輸血製剤の汚染が問題になり保存期間が3週間に短縮された。献血量の不足も問題である。実際に平成18年度、全国で使用されたMAP血だけでも572万単位にもおよび、前年に比較して1%増加している。高齢者の増加、若年者の減少といった社会的な問題も献血量不足を悪化していくだろう。

血液交差試験などのような輸血前検査は緊急輸血が必要な時には時間的コストがかかり、臨床に携わるものにとっては問題となることがある。

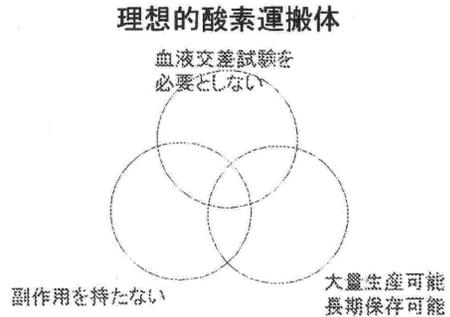
C型肝炎ウイルスやHIVウイルスなど、感染の危険性もある。ウィンドウピリオドにある供血者からの血液は偽陰性となる。過去の輸血に関連したHCV感染のように、未知の感染症に対しては防ぎようもない。近年、日本でも大きな社会問題になり、医療の信頼性に関わる大きな問題に発展したのは記憶に新しい。

同種血輸血自体にも問題があり、GVHDやTRALI等である。これらを防ぐために平成18年度から日本赤十字社では白血球を除去したRCCが供給されている。

理想的な酸素運搬体を考える

理想的な酸素運搬体とはどのようなものであろうか？表4に理想的酸素運搬体の条件を示す。理想的酸素運搬体は、医療現場だけでなく、大規模災害における危機対応としての役割も担うことが期待できる。

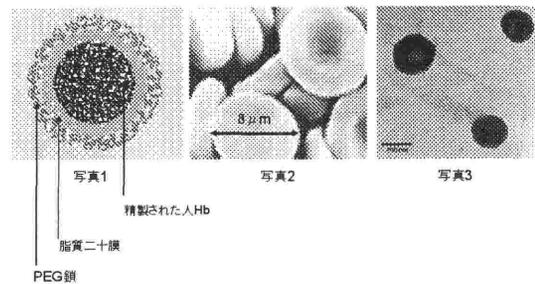
表4 理想的酸素運搬体



現在まで多くの人工酸素運搬体の研究がなされてきたが、最近10年の進歩は目覚しく、一部の国では臨床応用や臨床治験されるまでになった。今回われわれは、早稲田大学理工学部、土田英俊先生の協力を得て、同大学で開発された人工赤血球 (Hemoglobin-Vesicle ;HbV) の研究に携わる機会を得たのでここで紹介させていただく。

写真1, 2, 3

Hemoglobin-Vesiclesとは



HbVとは？

HbVは、保存期間の過ぎたヒトHbを精製し、人工脂質二重膜で封入し表面にポリエチレングリコール鎖を配したものである(写真1, 2, 3)。特徴としては表面抗原を持たない、ヒト赤血球より径が小さい(1/40)が変形能はないことなどが挙げられる⁷⁾。次に表5に人工酸素運搬体の問題点を挙げる。まず、酸素運搬能はヒト赤血球と同じかどうか？“白い血液”のように酸素解離曲線を持たないと臨床応用は難しい。次に、HbVによる血管収縮作

用はあるのか？ これは修飾Hb4量体の臨床試験の失敗⁸⁾に見られるように、血管内皮細胞の間隙に浸透しNO補足による副作用としての血管収縮、高血圧が知られているからである。3番目に、凝固系への影響はどうか？ 代用血漿の大量投与が戦争による負傷者の死亡率を増加させた原因のひとつには出血量の増加かもしれない。4番目に、HbV自体の生体への影響はどうか？ これは血液製剤については、保存中に白血球や血小板から放出されるサイトカインによる副作用が懸念されるが、HbVでは製剤自体からの産生がないことは有利である。しかし異物であるHbV投与に際して血中のIL-6やTNF- α の増加の可能性がある。5番目に、外傷後多臓器不全と肺への影響はどうか？ これは、ISS15以上の患者に12時間以内6単位以上の輸血は多臓器不全の独立危険因子であるという報告や実験的に輸血による肺障害の報告があることなどから、HbVに関してもこれらのことが検証されなければならない。つまり、先行する外傷やショックによる侵襲に加え、HbVの投与自体が二次的侵襲とならないかということである。

表5 人工酸素運搬体の問題点
人工酸素運搬体の問題点

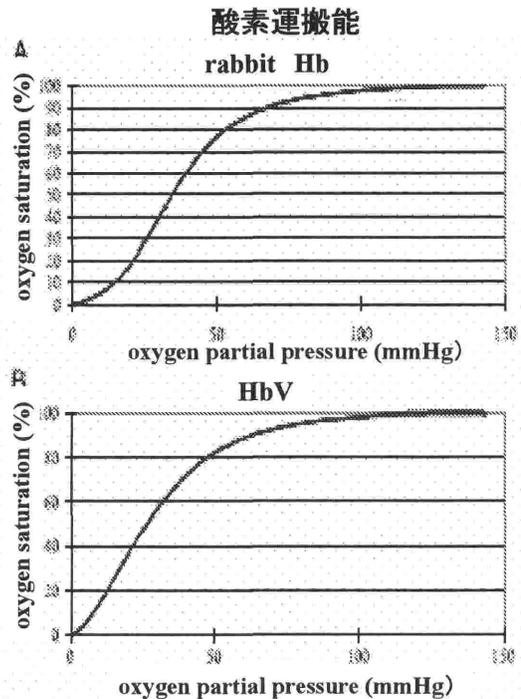
- 酸素運搬能
 - 生体の赤血球と相違は？
- 血管収縮作用(NO scavenger)
 - 修飾Hb4量体の臨床試験の失敗(J Am Med Assoc 1999)
- (抗)凝固作用の評価
- 炎症反応
 - 異物としての生体内反応
- 外傷後多臓器不全と肺障害
 - ISS15以上の患者12時間以内6単位以上の輸血はMOFの独立危険因子(Arch Surg 1997)
 - 実験的に輸血は肺障害を来たす(J Clin Invest 1998)

現在までの研究結果

1) 酸素親和性

図1に人工赤血球の酸素解離曲線とウサギHbの酸素解離曲線を示す。ほぼ同じシグモイドカーブを示しており、P50の値も27~30とヒトHbに近似した。

図1 酸素運搬能



2) 出血性ショックに対する蘇生

図2に、ウサギ出血性ショックモデルを作成し、HbV、リコンビナント5%アルブミン(rHSA)溶液、乳酸リンゲル液(LR)、3倍量の乳酸リンゲル液(3×LR)、リコンビナント5%アルブミン加HbV溶液で蘇生したデータを示す。平均動脈圧、中心静脈圧、心係数において脱血時にはそれぞれの群間で有意差はなく、蘇生後2時間後においてHbV群とLR群で有意差が見られた。HbV投与により、base excessや乳酸値の早期回復が見られた⁹⁾。

3) 臓器酸素運搬能

図3にウサギ出血性ショックモデルの蘇生実験の際に酸素電極を脳、腎臓、肝臓、筋肉に装着し、蘇生後15分後、1時間後、2時間後に酸素分圧を計測した。その結果、脳と腎臓において蘇生後HbV群で酸素分圧がベースラインに回復し、2時間以上維持された。肝臓や筋肉では脳や腎臓に比べ、ベースラインへの回復が遅いものの、1時間後、2時間後でLR群に比べ酸素化の改善が認められた。

図2 ウサギ出血性ショックモデルにおける平均動脈圧,中心静脈圧,心係数の経時的変化

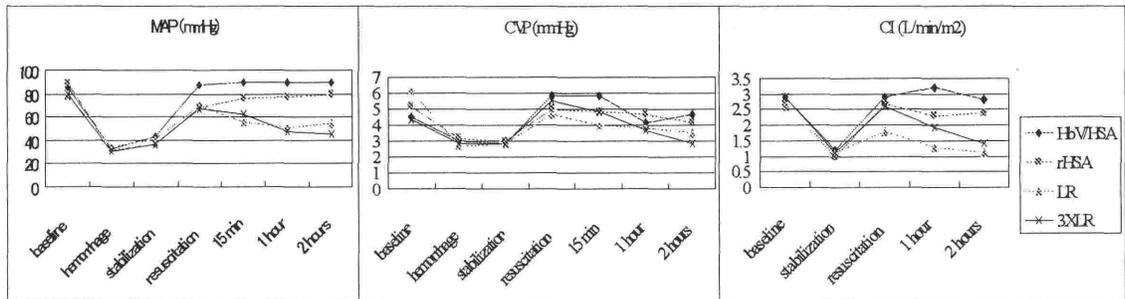
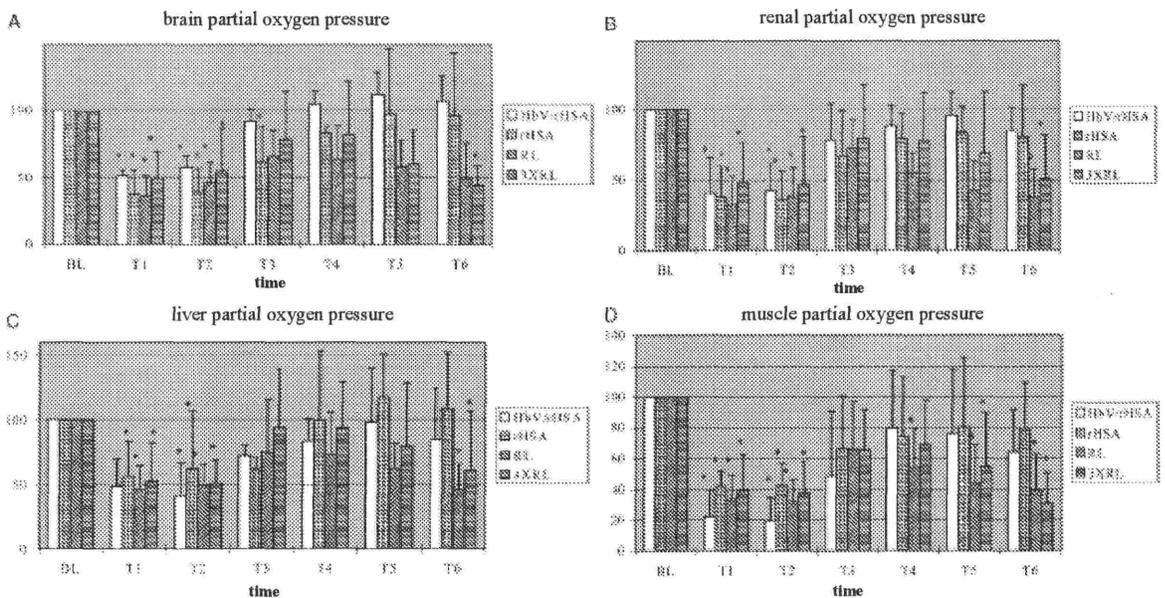


図3 主要臓器の組織酸素分圧: Base line (BL). Hemorrhagic shock (T1). After stabilization for 30 min (T2). Resuscitation over 15 min (T3). Further measurements for 15 min (T4), 1h (T5), and 2h (T6) after fluid resuscitation.

*Significant different from BL(P<0.05). +Significant difference from the RL group(P<0.05)

臓器酸素分圧の変化



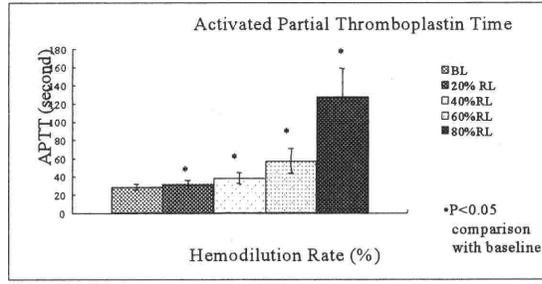
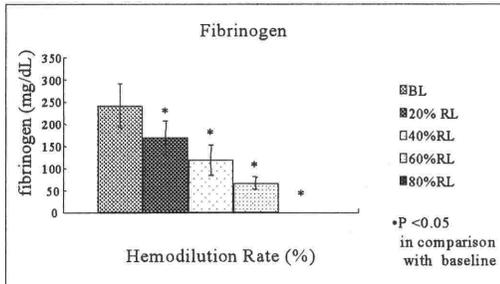
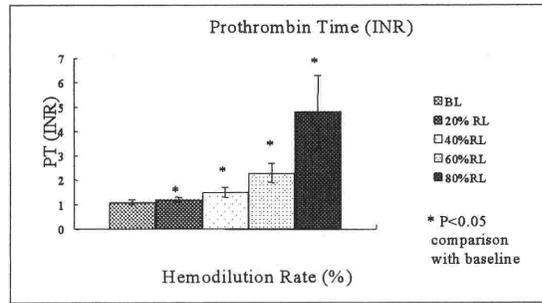
4) 凝固機能への影響

図4に凝固能への影響を調べた結果を示す。健康成人ボランティアの採血血液に対し、乳酸リンゲル液でそれぞれ20%, 40%, 60%, 80%希釈を行った。それぞれのフィブリノゲン濃度, プロトロンビン時間, 活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。乳酸リンゲル液の希釈では, 希釈率が高くなるにつれてPT, APTT値は延長し, フィブリノゲン値は低下し

た。図5に同様に乳酸リンゲル液またはHbV溶液で20%, 40%, 60%, 80%の希釈を行いソノクロットで測定した結果を示す。結果から80%希釈においてHbV溶液群はLR群に比べて凝固抑制を示した。60%希釈までは両群間に有意差は認めなかった。コントロールのついていない出血性ショックに対する凝固因子や血小板を含まないHbV単独での蘇生は危険かもしれない。

図4 ヒト全血に対する希釈

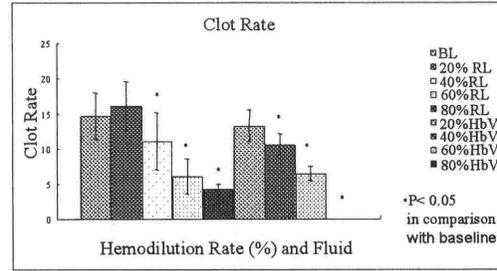
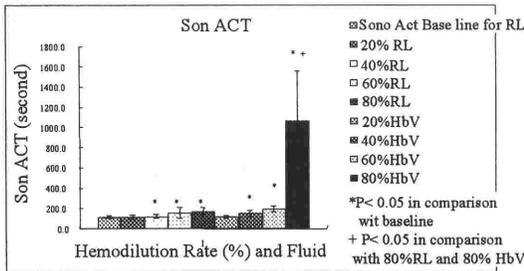
健康成人ボランティアの採血に対する
 乳酸リンゲル液 (RL)と10%HbV溶液に
 よる血液希釈
 RL溶液ではフィブリノーゲン濃度、プロ
 トロンビン時間、活性化トロンボプラスチ
 ン時間を測定
 また、両群のソノクロット測定値を比較



Fibrinogen (mg/dL)

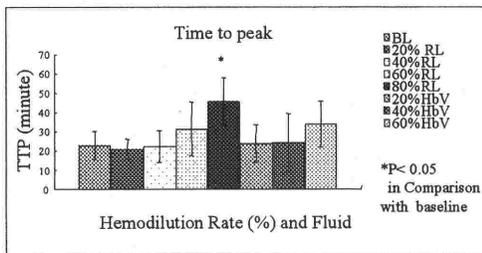
APTT (seconds)

図5 ソノクロットデータ比較



Son-ACT

clot rate



time to peak

80%血液希釈では、HbVのソノクロット
 データは、LR溶液に比べ凝固抑制
 を示す
 60%血液希釈までは、両群間に有意
 差が見られない

5) 単純投与による生態への影響

次に、HbV 溶液が生体にどのような影響を
 与えるか調べた。S-D ラットを使用し、推定
 循環血液量の 20%の HbV 溶液を投与し、肺の
 TNF- α , HO-1, HIF1- α , iNOS, ICAM の遺伝

子発現を 2 時間後、24 時間後、72 時間後にそ
 れぞれ計測した。測定方法は RT-PCR 法、比較
 CT 法を用いた。結果を図 6 に示す。2 時間後
 の TNF- α にのみ有意差が認められた。

図6 HbVの生体への影響

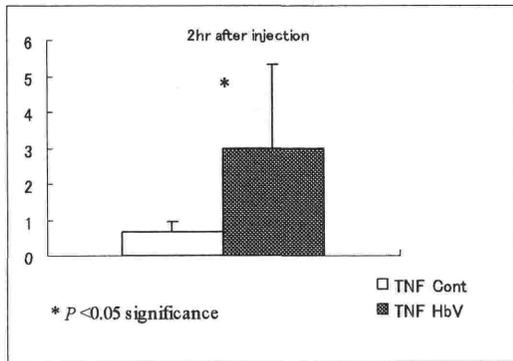
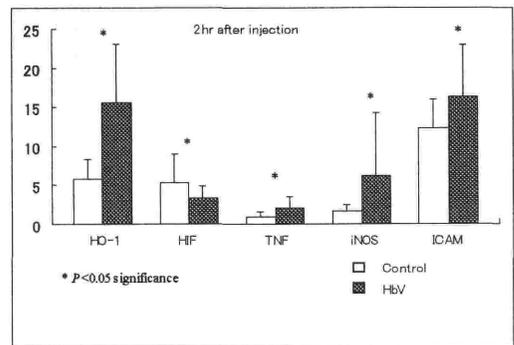


図8 肺における mRNA 発現



6) 出血性ショック後の主要臓器への影響

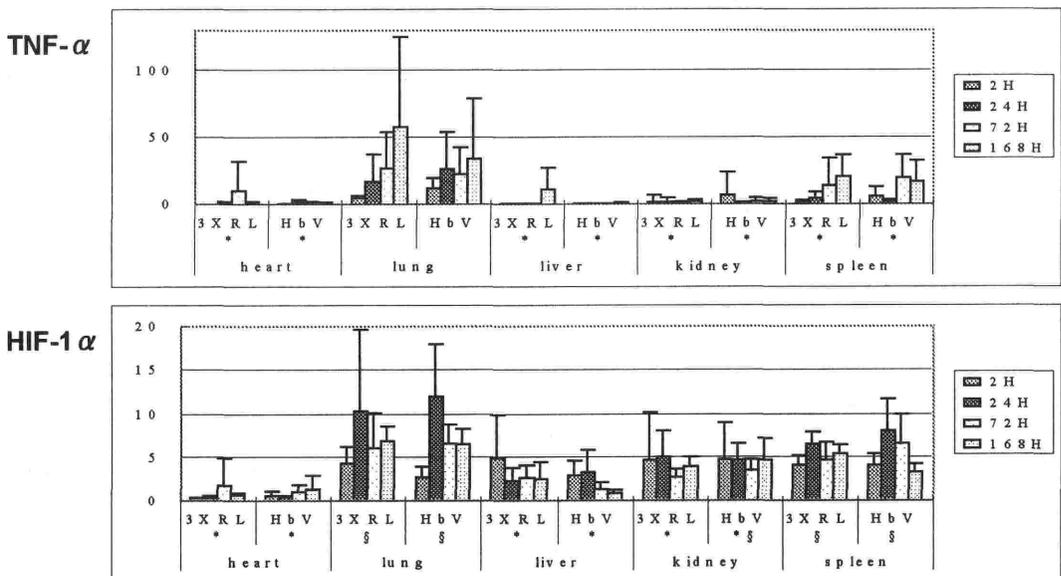
さらに推定循環血液量の 50%出血性ショックモデルをS-Dラットを用いて作製し、蘇生後、TNF- α , HIF1- α の臓器遺伝子発現を2時間後、24時間後、72時間後、168時間後に計測した。結果を図7に示す。明らかに他臓器に比べ、肺において有意に発現しているのがわかる。しかし、HbV群とLR群の両群間で有意差は認められなかった。このことより、出血性ショックが生体にとって大きな侵襲であり、HbV投与が二次的侵襲とならないことを示唆している。

7) 輸血後肺障害への影響

そこで肺において同様に出血性ショックモ

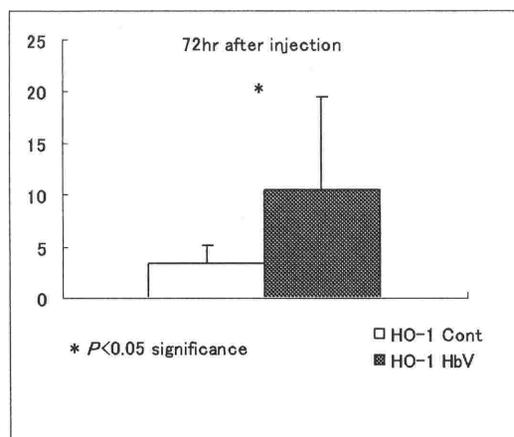
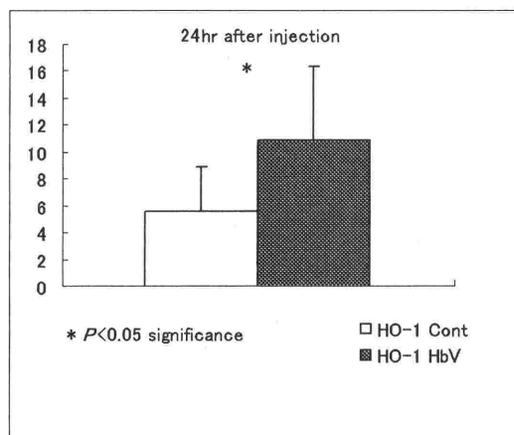
デルを作製し、蘇生2時間後、24時間後、72時間後のTNF- α , HO-1, HIF1- α , iNOS, ICAMの遺伝子発現を計測した。結果を図8に示す。蘇生開始2時間後でHIF1- α を除く全ての発現が増加しており、HbV群で発現増強していた。しかし24時間後、72時間後では両群間で有意差は認められなかった。逆にHIF1- α はHbV群で発現が抑えられていた。これはHbVが出血性ショック下生体に対して二次的侵襲を惹起したのではないかと考えられる。しかし、24時間後、72時間後で有意差がないことよりその程度が軽度のものではないかと推測される。また、HbVの酸素運搬能により酸素化が改善されたと推測される。

図7 出血性ショック後の主要臓器への影響, TNF- α および HIF1- α



HO-1 では 24 時間後, 72 時間後, HbV 群で有意に発現していた. 図 9 に示す. HbV は, 生体の Hb のように HO-1 ドナーとして臓器保護作用があるのではないかと推測される.

図 9 肺における HO-1 の mRNA 発現



8) まとめ

今回の研究の考察として, 酸素運搬能は生体赤血球とほぼ同じであり, 大量出血後の速やかな臓器酸素化能の改善効果が期待でき, HbV 溶液単独による 60%までの希釈は乳酸リンゲル液のそれと変わらない. しかし HbV 自体に若干の凝固抑制作用がある.

HbV の生体への投与における影響では, 大量出血後の HbV 投与による臓器の炎症反応は軽度である. その炎症反応は肺で強い. HbV も HO-1 ドナーとしての効果があり臓器保護的作用を有する可能性がある.

終わりに

今回, 重症病態と輸血-Hb ほどのレベルに保つべきか—ということで, 特に救急や周術期における輸血に関して, 私見を述べさせていただいた. また, 人工赤血球-HbV (早稲田型) に関する研究結果を発表した. 今後, さらに実験を進め人工赤血球の実現に向け努力していきたい.

謝辞

HbV を供与頂いた早稲田大学理工学部, 土田英俊教授ならびに酒井宏水准教授に深く感謝いたします. また, 今回体液代謝研究会で発表の場を頂いたことにつき今井孝祐先生に感謝申し上げます.

参考文献

- 1) 「輸血療法の実施に関する指針」及び「血液製剤の使用指針」(改訂版) 2005
- 2) C. Madjdpour, V. Heindl, D. R. Spahn : Risks, benefits, alternatives and indications of allogenic blood transfusions. MINERVA ANESTESIOLOGIA 72:283-9, 2006
- 3) Carson JL, Spence RK, Poses RM et al : Severity of anemia and operative mortality and morbidity. Lancet 1:727-9, 1988
- 4) Spence RK, Carson JA, Poses R et al : Elective surgery without transfusion : Influence of preoperative hemoglobin level and blood loss on mortality. Am J Surg 159:320-4, 1990
- 5) Spence RK, Alexander JB, DelRossi AJ et al : Transfusion guidelines for cardiovascular surgery : Lessons learned from operations in Jehovah's Witness. J Vasc Surg 16:825-31, 1992
- 6) Richard B. Weiskopf, Pearl Toy, Harriet W. Hopf et al : Acute isovolemic anemia impairs central processing as determined by P300 latency. Clinical Neurophysiology 116:1028-32, 2005
- 7) 土田英俊, 宗慶太郎, 酒井宏水 : 酸素輸液 (人工赤血球) の安全度と体組織への酸

素供給：麻酔 52 増刊：S55-S66,2003

- 8) Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D et al :
Diaspirin cross-linked hemoglobin
(DCLHb) in the treatment of severe traumatic
hemorrhagic shock : a randomized controlled
efficacy trial. J Am Med Assoc 282:1857-64,
1999
- 9) Terajima K, Tsueshita T, Sakamoto A,
Ogawa R. Fluid resuscitation with
hemoglobin vesicles in a rabbit model of
acute hemorrhagic shock. Shock. 25:184-9,
2006