

—原 著—

出血性ショックに対する liposome-encapsulated hemoglobin が 腸管組織酸素代謝に与える影響

小野寺謙吾¹ 増野 智彦¹ 平川 慶子² 相星 淳一³
植草 協子² 小池 薫⁴ 大野 曜吉⁵ 山本 保博¹

¹日本医科大学大学院医学研究科侵襲生体管理学

²日本医科大学法医学

³東京医科歯科大学救急災害医学

⁴京都大学大学院医学研究科初期診療・救急医学

⁵日本医科大学大学院医学研究科法医学

The Effect of Liposome-Encapsulated Hemoglobin for Intestinal Oxygen Metabolism Following Hemorrhagic Shock

Kengo Onodera¹, Tomohiko Masuno¹, Keiko Hirakawa², Junichi Aiboshi³,
Kyoko Uekusa², Kaoru Koike⁴, Youkichi Ohno⁵ and Yasuhiro Yamamoto¹

¹Department of Emergency and Critical Care Medicine, Nippon Medical School Graduate School of Medicine

²Department of Legal Medicine, Nippon Medical School

³Department of Acute Critical Care and Disaster Medicine, Tokyo Medical and Dental University

⁴Department of Primary Care and Emergency Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine

⁵Department of Legal Medicine, Nippon Medical School Graduate School of Medicine

Abstract

Introduction: Splanchnic hypoperfusion is central to the pathogenesis of acute respiratory dysfunction syndrome (ARDS) and multiple organ dysfunction syndrome (MODS) after hemorrhagic shock (HS), which is a leading cause of mortality in patients with severe trauma; however, the underlying mechanism remains unclear. The purpose of this study was to examine whether liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) improves oxygen metabolism in rat small intestine after HS.

Methods: HS was induced by withdrawing blood, and mean arterial pressure was maintained at 40 mmHg for 30 minutes. Rats were then resuscitated with shed blood + 2 × shed blood volume in normal saline or LEH (equivalent volume to shed blood) + 2 × shed blood volume in normal saline over 120 minutes. The small intestines were harvested at four different time points: before HS, after HS, and at 40 and 120 minutes of resuscitation. The tissue levels of lactate and alanine (μmol/g) were measured with ¹H magnetic resonance spectroscopy. Data are expressed as means ± SD and were compared by means of one-way analysis of variance followed by post hoc analysis using Fisher's protected least significant difference (n = 5 in each group).

Correspondence to Kengo Onodera, Department of Emergency and Critical Care Medicine, Nippon Medical School Graduate School of Medicine, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

E-mail: kengoo@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

Results: There was no significant difference in hemodynamics between the shed blood and LEH groups. Improvements in intestinal lactate and alanine levels with resuscitation were equivalent in between the shed blood and LEH groups.

Conclusion: LEH appears to have a comparable oxygen carrying capacity to blood and may serve as a useful blood substitute.

(日本医科大学医学会雑誌 2007; 3: 89-95)

Key words: artificial blood, hemorrhagic shock, intestinal ischemia, multiple organ dysfunction syndrome, acute lung injury

緒言

出血性ショックに引き続き起こる急性肺傷害 (acute lung injury: ALI) や多臓器障害症候群 (multiple organ dysfunction syndrome: MODS) は、重症外傷患者の主要な死亡原因であるが^{1,2}、その発生機序はいまだ解明されていない。これまでの研究により出血性ショック時に生じる臓器低灌流、特に腸管血流の低下が遠隔臓器障害の発生に深く関わっていることが示されている³⁻⁶。出血性ショック時には、循環血液は脳や心臓、肺などの重要臓器に配分されるため、腸管血流は著明に低下し、循環動態が改善された後も腸管虚血は持続することが知られている⁷⁻¹¹。虚血により損傷を受けた腸管から様々な炎症性メディエーターが産生され、腸間膜リンパ液を介して大循環に流入し、好中球や血管内皮細胞を活性化して遠隔臓器損傷を惹起することが最近の研究で明らかとなってきた¹²⁻¹⁷。

また、ショック後の蘇生輸液として人工酸素運搬体を投与することで、引き続き発症する肺障害や多臓器不全の発症を軽減するとの報告が、この数年間になされている¹⁸⁻²¹。われわれのこれまでの動物実験でも、人工酸素運搬体を出血性ショック後の蘇生輸液として用いた場合、好中球活性化が抑制されることを明らかにした²²。その機序として、われわれが実験で用いた人工酸素運搬体: liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) は小径、低粘稠性で酸素運搬効率が高いという特徴を持つことから²³⁻²⁵、ショックで収縮した血管内を循環するのに適しているためと考えられる。そこで本研究では、LEH をショック後の蘇生輸液として用いた際、虚血に陥った腸管の酸素負債を早期に改善するのではないかと考え、腸管組織の lactate および alanine を proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) を用いて測定し、腸管組織酸素代謝に対する影響を検討した。

対象と方法

本研究は日本医科大学動物実験倫理委員会により承認された。

LEH の調整

ヒト赤血球由来の stroma free hemoglobin (SFH) に inositol hexaphosphate (IHP) を添加し、水素添加大豆レシチン (hydrogenated soybean phosphatidylcholine / cholesterol / myristic acid / α -tocopherol = 7 : 7 : 2 : 0.28) の脂質混合物を純水で膨張させ、IHP 添加 SFH を加え、高速攪拌機で処理し liposome 化した。未封入のヘモグロビンを遠心洗浄で除去し、フィルター濾過および限外濾過により濃縮。その後、最終ヘモグロビン濃度を 6 g/dl に調整した。

ラット出血性ショックモデル

体重 350~400 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用した。ketamine hydrochloride (65 mg/kg) (KETALAR 50[®], 三共株式会社) と xylazine (0.7 mg/kg) (2- [2,6-dimethylphenylamino] -4H-5,6-dihydrothiazine hydrochloride, SIGMA CHEMICAL CO. USA) を腹腔内投与し麻酔した。体温は直腸温度計 (YSI 4000A thermometer, (株) 日機装ワイエスアイ) で測定し、加温 lamp を用いて 37.5~38.5°C に維持した。大腿動静脈に heparin 加生理食塩水 (10 単位/ml) を満たした polyethylene tube (外径 0.96 mm, 内径 0.58 mm, SP45, (株) 夏目製作所) を留置した。動脈に挿入した polyethylene tube は動脈圧 monitor (polygraph system RM-6000, (株) 日本光電) に接続し、持続的に血圧を測定した。その後、Bollman-type resting cage (KN 式 Bollman cage II 型, (株) 夏目製作所) に固定した。平均動脈圧が 100~110 mmHg に安定した時点で、平均血圧が 40 mmHg

に達するまで、1 ml/min の速度で脱血した。その後、必要に応じて脱血と返血を繰り返し、同血圧レベルを30分間維持した。ショック終了後、I) 全血群：脱血した全血+生理食塩水（脱血量の2倍量）、II) LEH群：LEH（脱血量と等量）+生理食塩水（脱血量の2倍量）を2時間かけて静脈投与した。

ラット腸管組織の採取

ラット出血性ショックモデルのA；ショック前（n=5）、B；ショック終了時（n=5）、C；全血群の蘇生開始40分後（n=5）、D；蘇生開始120分後（n=5）、E；LEH群の蘇生開始40分後（n=5）、F；蘇生開始120分後（n=5）の各ポイントで開腹し回腸末端部を約5cm切除した。¹H-MRS測定のために回腸を切除したラットは、1ポイントの回腸切除に対して一匹ずつとし、回腸切除後速やかに安楽死させた。切除した検体はすみやかに液体窒素中で凍結し、¹H-MRS測定まで-80℃で保存した。

Sham群では、脱血、開腹腸管切除を行わず、麻酔下に全血群・LEH群と同じ時間経過で血圧モニターと血中 lactate 値の測定を行った。

¹H-MRSによる腸管組織 lactate および alanine の測定

A~Dで採取した検体を、凍結プレス破碎装置（CRYO-PRESS[®], MICROTTEC CO.）にて液体窒素下で粉末状とし、2 ml の冷過塩素酸（0.6規定）を加えて攪拌した。3,000 rpm 10 min の遠心分離後の上清を¹H-MRSで分析した。測定は7.0 Tesla Fourier transformation (FT)-MR spectrometer (LA-300WB, (株)日本電子)を用いてprotonの共鳴周波数300 MHz, pulse繰り返し時間10.5 sec, 観測範囲6,000 Hz, 軽水のsignalをhomogated decoupling methodにて抑制し、200回の積算を行った。lactateおよびalanineの0.6規定過塩素酸標準溶液にて確認したchemical shift値から検体のspectrum上のlactateおよびalanineの-CH₃由来のpeakをassignし、それぞれのpeak面積を用いてlactateおよびalanineの定量を行った。物質の濃度は湿重量当たりのmole濃度（平均±標準偏差）で示した。

血中 lactate 測定

出血性ショックモデルにおいて、A~Dの4ポイントでそれぞれ200 μlの動脈血を採取し、4℃、10,000 g、20分間の条件で遠心分離した後、上清を-80℃で測定まで保存した。収集した検体は、乳酸測定kit

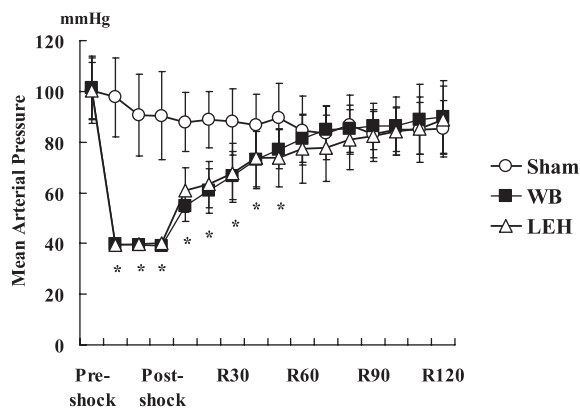


Fig. 1 Changes in mean arterial pressures (MAP). After rats were anesthetized, the left femoral artery was cannulated and MAP was continuously monitored. Hemorrhagic shock was induced by withdrawing arterial blood (1 ml/min). MAP was reduced to 40 mmHg and maintained for 30 minutes by reinfusing or withdrawing blood as needed. At the end of hemorrhagic shock, rats were resuscitated with shed blood+2× shed blood volume in normal saline (NS); whole blood (WB) group or LEH (equivalent volume to shed blood) + 2 × shed blood volume in NS; LEH group over 120 minutes. Sham group underwent identical procedures without hemorrhagic shock and resuscitation. Data are expressed as the mean ± SD. There was no difference in MAP between WB group and LEH group. At Pre-shock and R60 to R120, there were no differences MAP of WB, LEH and sham groups (*p<0.01). R30, 60, 90 and 120: at 30, 60, 90 and 120 minutes of resuscitation.

（乳酸「アスカ・シグマ」(株) 関東化学)を用い、乳酸測定装置 (COMBAS MIRA PULS (株) 日本 Roche) で血中 lactate を測定した。

統計

群間比較は一元配置分散分析法を用い、その後の多重検定は Fisher's protected least significant difference 法で解析し、危険率が0.05以下を有意差ありと判定した。

結果

血圧変動 (Fig. 1)

ショック中の平均動脈血圧低下は、全血群、LEH群において同程度であった。ショック後の蘇生に伴い血圧は上昇し、全血群とLEH群で全経過において有意差は認められなかった。また、全血群とLEH群は、

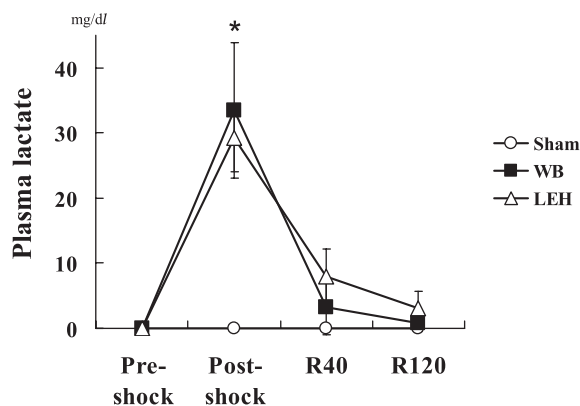


Fig. 2 Plasma lactate levels.

Blood samples (0.2 ml each) were collected from arterial line at pre-shock, post-shock, R40 and R120 (resuscitated at 40 and 120 minutes). The concentrations of lactate in arterial plasma were measured using an enzymatic assay (Sigma, St. Louis, Mo) and COBAS MIRA plus (Roche Diagnostics K.K., Tokyo). Data are expressed as mean \pm SD. There was no difference in lactate levels between whole blood (WB) group and liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) group.

*indicates that the plasma lactate levels at post-shock in WB and LEH groups was significantly greater than that the others ($p < 0.01$).

蘇生開始後 60 分の時点で sham 群と血圧が同程度まで改善し、実験終了まで維持された。

血中 lactate (Fig. 2)

全血群、LEH 群の血中 lactate 値は、ショック終了時で最高値に達し、その後時間経過とともに低下、蘇生開始 120 分後にはショック前値まで改善した。各測定ポイントにおいて全血群と LEH 群の血中 lactate 値に有意差はなく、ショックの程度、全身における酸素負債の改善程度は同程度であった。sham 群では、実験経過中、有意差なく低値のまま推移した。

腸管組織中 lactate および alanine (Fig. 3 a, b)

全血群、LEH 群の腸管 lactate 値はショック後に最高値に達し、蘇生開始 40 分後から速やかに低下、ショック前値、蘇生開始 40 分、120 分後値で有意差はなかった。alanine 値は、全血群、LEH 群で lactate と同様にショック終了時に最高値となり、蘇生開始とともに低下し、蘇生開始 120 分後にはショック前値と同程度まで改善した。実験経過中、全血群、LEH 群で各測定ポイントの腸管組織中 lactate および alanine 値に有意差はなく、腸管での虚血の程度、酸素負債の

Table 1 Characteristic of LEH

| | |
|------------------------------|-----------------------|
| Diameter | : 200nm |
| Components | |
| Stroma free hemoglobin | |
| Liposome | : Phosphatidylcholine |
| | : Cholesterol |
| | : Myristic acid |
| Inositol-hexaphosphoric acid | |
| Hemoglobin concentration: | 6 g/dl |
| Half life in serum | : 24 hr |
| Methemoglobin ratio | : \leq 5% |
| P ₅₀ | : 45 ~ 55 mmHg |
| Viscosity | : 2 cP |

改善程度に差は認めなかった。sham 群では、実験経過中、有意差なく低値のまま推移した。

考 察

1. 出血性ショック時の腸管虚血が全身に及ぼす影響

これまでの研究により、出血性ショックに引き続く ALI や MODS の発症には、腸管虚血が深く関与することが明らかとなってきている¹⁻³。Koike らはラットを用い、上腸間膜動脈遮断による小腸虚血・再灌流後に、遠隔臓器である肺に障害が生じることを示した²⁶。Moore や Deitch らは、出血性ショック後の腸管から様々な炎症性メディエーターが産生され、腸間膜リンパ液を介して全身循環に流入したメディエーターが直接的、あるいは、好中球の活性化を介して間接的に血管内皮細胞傷害を惹起し肺障害を引き起こすことを報告した^{4,6}。腸管は平常時では心拍出量の 30% もの灌流を受けているが、ひとたびショックに陥ると重要臓器への血流再分配により腸管血流は著しく低下し、全身の循環（血圧）が回復した後も腸管低灌流は長期にわたり遷延する⁷⁻¹¹。この腸管血行動態の急激な変化が、出血性ショック下において腸管が重要なターゲットオーガンとなるゆえんと考えられる。

2. 出血性ショック時の人工酸素運搬体の意義

近年、血液需要の増加と限りある医療資源の有効利用という観点から、人工酸素運搬体に注目が集まっている²⁷⁻²⁹。本研究で使用した人工酸素運搬体；LEH は、期限切れ保存血液から分離精製したヒトヘモグロビンをリン脂質二重膜で被覆したものであり、ヘモグロビン濃度は 6 g/dl と低く調整されている²³⁻²⁵。天然型赤血球に比べて小径、低粘稠性で酸素運搬効率が高い²⁵といった特徴を持つことから (Table 1)、ショッ

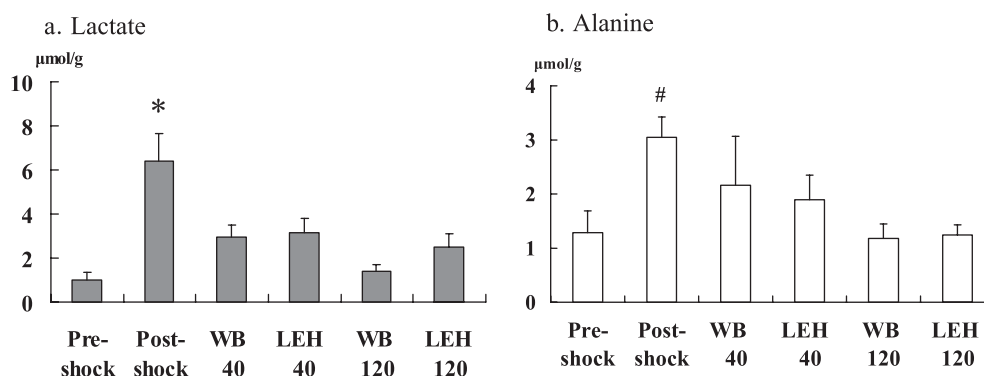


Fig. 3 a, b Lactate and alanine levels in the intestinal tissues.

At four different time points; pre-shock, post-shock, at 40 and at 120 minutes of resuscitation with shed blood or LEH solution, a midline laparotomy was performed and small intestine was removed immediately (n=5). The lactate and alanine levels were measured by ^1H magnetic resonance spectroscopy. Data are expressed as mean SD \pm SD.

a: Lactate level at post-shock was significantly greater than those at pre-shock, at 40 minutes of resuscitation with whole blood (WB 40), liposome-encapsulated hemoglobin (LEH 40), and at 120 minutes of resuscitation with WB, LEH (WB 120, LEH120) (* $p < 0.05$).

b: Alanine level at post-shock was significantly greater than those at pre-shock, at 120 minutes of resuscitation with whole blood (WB 120), liposome-encapsulated hemoglobin (LEH 120) (# $p < 0.05$).

クで収縮した血管内を循環するのに適していると考えられる。

最近の臨床研究において、ショック後の蘇生輸液として人工酸素運搬体を投与した場合、保存血に比べ好中球の活性化や全身の炎症変化が軽減され、死亡率も低下したと報告されている¹⁸⁻²¹。これまでのわれわれの研究においても、出血性ショック後の蘇生輸液としてLEHを用いた場合、LEHは腸間膜リンパ液を介した好中球の活性化を抑制することを報告している²²。さらにLEH投与により、ショックに引き続き生じる肺障害が軽減されるとの結果を得ている (unpublished data)。このLEHの持つ利点がどのような機序によりもたらされるのかを解明するため、われわれはLEHが天然型赤血球に比べてショック後の腸管虚血を早期に改善しているのではないかと仮説をたて、本実験を行った。

3. 出血性ショック時のLEHの有用性

本研究において、実験経過中のLEH群の平均動脈圧は全血群と比較して有意差なく推移した (Fig. 1)。これまでの人工酸素運搬体制剤では、副作用としてnitric oxide scavenge作用による血管収縮、血圧上昇が報告されている³⁰⁻³²。本研究では異常な血圧上昇を認めず、本研究で使用したLEHはこの点で他の製剤より安全性が高いことが示唆された。実験経過中の血

中 lactate 値は、LEH群と全血群で有意差を認めなかった (Fig. 2)。さらにわれわれは、腸管組織酸素代謝の指標として腸管組織中 lactate および alanine を ^1H -MRS を用いて測定した。 ^1H -MRS は proton (^1H) に由来する signal を用いて、生体試料に含まれるさまざまな代謝物質の非破壊的な測定が可能な分析手法である。脳、肝臓、心筋や骨格筋といった組織の代謝学的な研究に幅広く利用されており³³⁻³⁶、最近では、MRI装置を用いた in vivoでの測定も活発に行われるようになってきている³⁷。Lactateは嫌気性代謝が亢進した際に上昇する一般的な酸素負債の指標であるが、alanineも組織酸素負債の指標として有用とされる^{38,39}。本研究の結果、LEH群および全血群の腸管組織中 lactate, alanine 値はショック後に最高値となり、その後経時的に低下してショック前値まで改善し、血中 lactate と同様の変化を示した (Fig. 3)。また、腸管組織中の lactate, alanine 値は蘇生開始40分後、120分後のいずれの測定ポイントにおいても、LEH群と全血群で有意差なく変化した。ヘモグロビン濃度が天然型赤血球の約1/2に調整されたLEH投与により、天然型赤血球と同等の酸素負債改善効果が得られたとの結果は、LEHが有効な酸素運搬体であり、ショック後の蘇生輸液として有用である可能性を示唆するものである。

蘇生輸液中のヘモグロビン濃度の違いによる酸素負

債改善効果への影響を知るため、本実験に先立ち蘇生に血液を用いない群、つまり脱血量の3倍の生理食塩水のみで蘇生を行う群を設定し実験を行った。その結果、蘇生時に血圧が上昇せず実験が継続できなかった (unpublished data)。

蘇生後120分の腸管組織中 lactate 値が、有意差はないものの LEH 群でやや高い傾向を示し、また、血中 lactate 値や腸管組織の alanine 値でも同様の傾向を示した。天然型赤血球と LEH のヘモグロビン濃度の違いがこの結果に影響を及ぼしていた可能性がある。今後、ヘモグロビン含有量を天然型赤血球と同じ濃度まで増加させた LEH を使用し、同様の実験において酸素負債がより改善されるかを検討する必要があると考えられる。

本研究の結果からは、ショック後の腸管組織酸素代謝は LEH 群と全血群で同程度の改善であり、LEH が天然型赤血球に比べてショック後の腸管虚血をより早期に改善するとの仮説を証明することはできなかった。本研究では腸管組織の lactate, alanine 値測定を蘇生開始40分後、および120分後に行った。このため代謝の変化が、蘇生開始40分より早い時期に生じている可能性があり、さらに早期の組織代謝を観察する必要があると考えられた。

4. LEH の問題点と将来

LEH は生体適合性の高いリン脂質二重膜で被覆されているが、生体にとっては異物である。生体内投与後、速やかに脾臓や肝臓の網内系に取り込まれることから、生体防御機構への影響が懸念されるが、動物実験上これまで深刻な副作用は報告されていない⁴⁰⁻⁴²。今後、臨床試験において LEH の人体に対する影響を明らかにする必要がある。

人工酸素運搬体は LEH を含め、一般に保存血輸血に関連する細菌やウイルス感染の危険性が少ない^{27,28,43-45}。また、LEH は血液型適合の必要がないという大きな利点を持ち、保存期間が約2年間 (4°C) と長く、取り扱いも比較的容易であることから、通常の救急業務だけでなく、紛争地帯や災害現場での活躍も期待される。さらに、将来の血液供給事情を勘案すると、限りある医療資源の有効利用という観点から、临床上重要な意味を持っていくものと考えられる。出血性ショックに引き続き発症する ALI や MODS の病態解明や LEH の有用性を明らかにするため、今後さらなる研究を積み重ねていく必要がある。

結 論

ラット出血性ショックモデルに対して、人工酸素運搬体として開発された LEH を投与し、ショック後の全身および腸管の組織酸素代謝を、¹H-MRS を用いた lactate, alanine の測定により、評価検討した。その結果、LEH は天然型赤血球の約1/2の hemoglobin 濃度で、天然型赤血球と同等に全身および腸管の出血性ショック後組織酸素代謝を改善したことから、出血性ショックに対して有用な蘇生輸液と考えられる。

本研究の内容は、第30回日本救急医学会総会および第61回 American Association for the Surgery of Trauma で発表した。また、実験に使用した liposome-encapsulated hemoglobin を供給して頂いたテルモ株式会社に謝意を表します。

文 献

1. Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC: Postinjury multiple organ failure: A bimodal phenomenon. *J Trauma* 1996; 40: 501-512.
2. Deitch EA: Multiple organ failure, Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992; 216: 117-134.
3. Biffi WL, Moore EE: Splanchnic ischemia/reperfusion and multiple organ failure. *Br J Anaesth* 1996; 77: 59-70.
4. Deitch EA: Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7: 92-98.
5. Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, Burch JM, Cothren CC, Sauaia A: The role of the lung in postinjury multiple organ failure. *Surgery* 2005; 138: 749-758.
6. Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, Kim FJ, Biffi WL, Banerjee A: The posts ischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma* 1994; 37: 881-887.
7. Garrison RN, ZaKaria El R: Peritoneal resuscitation. *Am J Surg* 2005; 190: 181-185.
8. Fine J: The intestinal circulation in shock. *Gastroenterology* 1967; 52: 454-455.
9. Takala J: Determinants of splanchnic blood flow. *Br J Anaesth* 1997; 77: 50-58.
10. Toung T, Reilly PM, Fuh KC, Ferris R, Bulkley GB: Mesenteric vasoconstriction in response to hemorrhagic shock. *Shock* 2000; 13: 267-273.
11. Sinaasappel M, van Iterson M, Ince C: Microvascular oxygen pressure in the pig intestine during haemorrhagic shock and resuscitation. *J Physiol* 1999; 514: 245-253.
12. Zallen G, Moore EE, Johnson JL, Tamura DY, Aiboshi J, Biffi WL, Sillima CC: Circulating postinjury neutrophils are primed for the release of proinflammatory cytokines. *J Trauma* 1999; 46: 42-48.
13. Guo W, Ding J, Huang Q, Jerrells T, Deitch EA: Alterations in intestinal bacterial flora modulate the systemic cytokine response to hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1995; 269: G827-832.

14. Zallen G, Moore EE, Johnson JL, Tamura DY, Ciesla DJ, Silliman CC: Posthemorrhagic shock mesenteric lymph primes circulating neutrophils and provokes lung injury. *J Surg Res* 1999; 83: 83-88.
15. Gonzales RJ, Moore EE, Ciesla DJ, Biffl WL, Johnson JL, Silliman CC: Mesenteric lymph is responsible for post-hemorrhagic shock systemic neutrophil priming. *J Trauma* 2001; 51: 1069-1072.
16. Magonatti LJ, Upperman JS, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA: Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock. *Ann Surg* 1998; 228: 518-527.
17. Magnotti LJ, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA: Gut-derived mesenteric lymph. *Arch Surg* 1999; 134: 1333-1341.
18. Johnson JL, Moore EE, Offner PJ, Partrick DA, Tamura DY, Zallen G, Silliman CC: Resuscitation with a blood substitute abrogates pathologic postinjury neutrophil cytotoxic function. *J Trauma* 2001; 50: 449-456.
19. Johnson JL, Moore EE, Gonzalez RJ, Fedel N, Partrick DA, Silliman CC: Alteration of the postinjury hyperinflammatory response by means of resuscitation with a red cell substitute. *J Trauma* 2003; 54: 133-140.
20. Masuno T, Moore EE, Cheng AM, Moore PK, Grant AR, Johnson JL: Prehospital hemoglobin-based oxygen carrier resuscitation attenuates postinjury acute lung injury. *Surgery* 2005; 138: 335-341.
21. Moore EE, Cheng AM, Moore HB, Masuno T, Johnson JL: Hemoglobin-based oxygen carriers in trauma care: Scientific rationale for the US multicenter prehospital trial. *World J Surg* 2006; 30: 1247-1257.
22. 柿沼敏行, 相星淳一, 小池 薫, 小野寺謙吾, 久志本成樹, 山本保博: 出血性ショックに対する liposome-encapsulated hemoglobin が腸間膜リンパ液中の好中球活性物質に与える影響. *日救急医会誌* 2004; 15: 579-586.
23. Yoshioka H, Suzuki K, Miyauchi Y, Takahashi A: Characteristics of Neo Red Cells and their in vivo oxygen transport capacity. *Artificial Organs* 1990; 14: 211-212.
24. Usuba A, Motoki R, Suzuki K, Sakaguchi K, Takahashi A: Study of effect of the newly developed artificial blood "Neo Red Cells (NRC)" on hemodynamics and blood gas transport in canine hemorrhagic shock. *Biomater Art Cells & Immob Biotech* 1992; 20: 531-535.
25. Usuba A, Osuka F, Kimura T, Sato R, Fujita Y, Yamashita M, Hoshino C: Liposome encapsulated hemoglobin as a resuscitation fluid for hemorrhagic shock. *Artificial Organs* 1998; 22: 116-122.
26. Koike K, Moore EE, Moore FA, Kim FJ, Carl VS, Banerjee A: Gut phospholipase A₂ mediates neutrophil priming and lung injury after mesenteric ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1995; 268: G397-403.
27. Stowell CP: Hemoglobin-based oxygen carriers. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 537-543.
28. Moore EE: Blood substitutes: The future is now. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 1-17.
29. Moore FA, McKinley BA, Moore EE: The next generation in shock resuscitation. *Lancet* 2004; 363: 1988-1996.
30. Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M: Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H908-H915.
31. Vane LA, Funston JS, Kirschner R, Harper D, Deyo DJ, Traber DL, Traber LL, Kramer GC: Comparison of transfusion with DCLHb or pRBCs for treatment of intraoperative anemia in sheep. *J Appl Physiol* 2002; 92: 343-353.
32. Winslow RM: Current status of blood substitute research: towards a new paradigm. *J Intern Med* 2003; 253: 508-517.
33. Hirakawa K, Uekusa K, Sato S, Nihira M: MRI and MRS studies on acute effects of ethanol in the rat brain. *Jpn J Legal Med* 1994; 48: 63-74.
34. Lehnhardt FG, Rohn G, Ernestus RI, Grune M, Hoehn M: ¹H- and ³¹P-MR spectroscopy of primary and recurrent human brain tumors in vitro: malignancy-characteristic profiles of water soluble and lipophilic spectral components. *NMR Biomed* 2001; 14: 307-317.
35. Igarashi H, Kwee IL, Nakada T, Katayama Y, Terashi A: ¹H magnetic response spectroscopic imaging of permanent focal cerebral ischemia in rat: longitudinal metabolic changes in ischemic core and rim. *Brain Research* 2001; 907: 208-221.
36. Vejchapipat P, Williams SR, Spitz L, Pierro A: Intestinal metabolism after ischemia-reperfusion. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 759-764.
37. Blum H, Summers JJ, Schnell MD, Barlow C, Leigh JS Jr, Chance B, Buzby GP: Acute intestinal ischemia studies by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ann Surg* 1986; 204: 83-88.
38. Dunham CM, Fabian M, Siegel JH, Gettings L: Relationship of plasma amino acids to oxygen debt during hemorrhagic shock. *Circ Shock* 1991; 35: 87-95.
39. Mithieux G: New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001; 4: 267-271.
40. 阿部英樹, 藤原満博, 東 寛, 池田 久: リボソームと補体系との相互作用. *人工血液* 2003; 11: 153-161.
41. Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, Ikeda E, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E: Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials* 2004; 25: 4317-4325.
42. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers; influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 2001; 159: 1079-1088.
43. Moore FA, Moore EE, Sauaia A: Blood transfusion: An independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 1997; 132: 620-625.
44. Aiboshi J, Moore EE, Ciesla DJ, Silliman CC: Blood transfusion and the two-insult model of post-injury multiple organ failure. *Shock* 2001; 15: 302-306.
45. Offner PJ, Moore EE, Biffl WL, Johnson JL, Silliman CC: Increased rate of infection associated with transfusion of old after severe injury. *Arch Surg* 2002; 137: 711-717.

(受付: 2006年12月27日)

(受理: 2007年2月13日)