

令和元年9月3日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11435

研究課題名(和文)止血能を有した救命蘇生用人工血液カクテルの開発

研究課題名(英文) Combination therapy using fibrinogen gamma-chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes and hemoglobin vesicles for trauma-induced massive hemorrhage

研究代表者

萩沢 康介 (Hagisawa, Kohsuke)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生理学・助教)

研究者番号：50539244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：家兔の循環血液量の2倍に相当する量を脱血し赤血球成分のみを返血することで、急性血小板減少による易出血性病態を作製した。そして肝臓に外傷性損傷を作り出血させ、Hbが6g/dl以下となる出血性ショックを誘導した。これに対してH12-(ADP)-liposomesとHbV、血漿成分を投与することでショック病態と凝固障害を改善させ、24時間以上の生存をもたらすことができた。これらの人工血液は長期保存が可能でプレホスピタルでの使用にも適しており、大量出血の早期から投与することで外傷による出血性ショックと凝固障害を合併した治療困難な病態の救命率向上が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

救急医療の現場ではhemostatic resuscitationの概念が導入され、大量出血患者には過剰な輸液は排し、赤血球輸血とともに血小板輸血や血漿輸液を当初から行うことで急性期予後の改善することが報告されている。また重傷の傷病者には、血漿:血小板:赤血球を1:1:1の比率で投与することが推奨されている。

本研究において用いた人工酸素運搬体(HbV)と人工血小板凝集補助物質(H12-(ADP)-liposomes)を組み合わせることで、これまで有効な手段がなかったプレホスピタルでの止血救命に資する蘇生輸液の開発につながると考える。

研究成果の概要(英文)：HbVs and H12-(ADP)-liposomes were safely and effectively administered for acute hemorrhagic shock and trauma-induced coagulopathy in a rabbit model. There were no serious adverse events in this animal study. We hope that these blood substitutes are useful tools for resuscitation prior to hospitalization.

研究分野：循環器生理学

キーワード：救急医療 凝固障害 出血性ショック

## 1. 研究開始当初の背景

重症外傷では時に大量出血を合併する。これに対する初期治療としては、まず細胞外液量を補充して体循環を安定させることを目的に、晶質液やコロイド含有液を投与する。さらに出血量に応じて、濃厚赤血球輸血を適宜追加することが多い<sup>1</sup>。しかし、このような病態では出血部位局所で組織因子の放出を契機として止血凝固系が活性化・消費されるとともに、全身的には大量輸液・輸血(赤血球輸血)により凝固因子や血小板が相対的に希釈されるため、凝固障害が生じ易出血性となる。

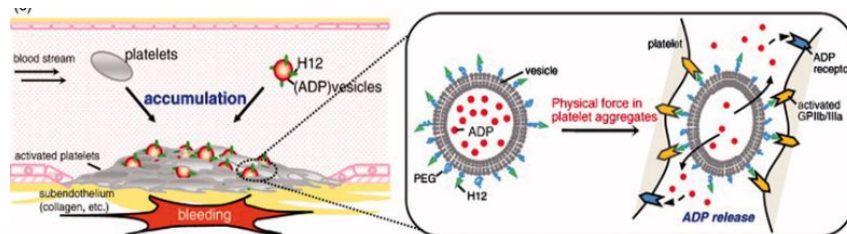
また、待機手術の現場において、日本麻酔科学会の報告(日臨麻会誌 2007)によると、術後7日以内に死亡した 3,542 症例の半数は大量出血が原因であった。日本産科婦人科学会が中心になって編纂された「産科危機的出血対応ガイドライン」では、赤血球とともに新鮮凍結血漿・血小板濃厚液を直ちに投与することを推奨し、その際には赤血球の輸血量に匹敵する以上の血小板投与量を考慮すべきとしている。(図1)

産科出血・補充療法のコツ 図1  
10-15-20ルール

	最低レベル	0から最低レベルまでの必要量
赤血球濃厚液 (MAP血) 140ml	Hb: 6g/dL	10単位
新鮮凍結血漿 (FFP) 80ml	フィブリノゲン 100mg/dL	15単位
血小板濃厚液 20ml	血小板: 5万/ $\mu\text{L}^3$	20単位

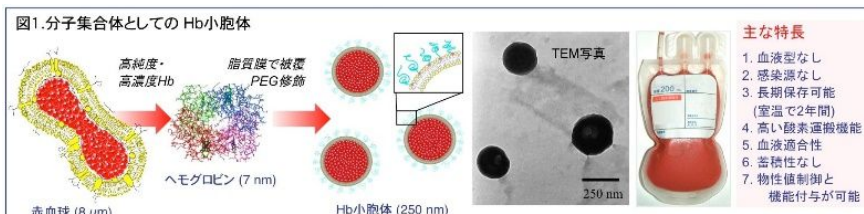
近年、救急医療の現場では hemostatic resuscitation の概念が導入され、大量出血患者には過剰な輸液は排し、赤血球輸血とともに血小板輸血や血漿輸液を当初から行うことで急性期予後の改善することが報告されている<sup>2</sup>。また重傷の傷病者には、血漿:血小板:赤血球を 1:1:1 の比率で投与することが推奨されている<sup>3</sup>。

我々はリポソームに基づく血小板代替物 H12-(ADP)-liposomes (平均径 210nm)を開発してきた。H12-(ADP)-liposomes は膜の表面にフィブリノゲン  $\gamma$  鎖カルボキシル末端にある HHLGGAKQAGDV 配列の 12 個のペプチド(H12)を組み込むとともに、リポソーム膜の内部にアデノシン 5'-ニリン酸(ADP)を含有させている<sup>4</sup>。これにより、血小板とともに血漿中のフィブリノゲンが減少した病態でも、多点結合を介した血小板凝集を引き起こし、残存した血小板の凝集反応を増強する。(図2)



これまでに、血小板数が 5 万を下回った致死性の希釈性凝固障害動物モデルに対し、H12-(ADP)-liposomes が血小板凝集と血液凝固を促進し、血小板代替物として機能し、止血救命できることを報告してきた<sup>5</sup>。

いっぽう HbV は平均径 250nm でリポソーム内にヒト由来ヘモグロビンを含有し、



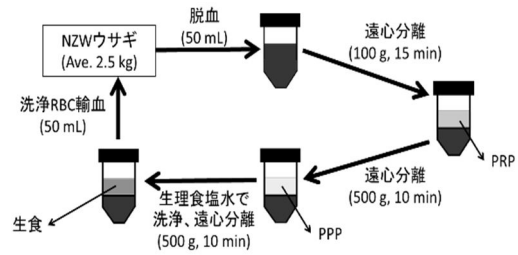
Hb 値 10g/dl に相当する酸素運搬能を有している<sup>6</sup>。(図3)

## 2. 研究の目的

これらの人工赤血球 (HbV) と人工血小板 (H12-(ADP)-liposomes) を組み合わせることで、これまで有効な手段がなかったプレホスピタルでの蘇生輸液 (輸血代替) を確立することにある。

## 3. 研究の方法

本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会による承認を受け実施した。家兔の循環血液量の2倍以上に相当する計 200mL/kg を脱血し、血小板並びに血漿成分を遠心分離した後、赤血球成分のみを返



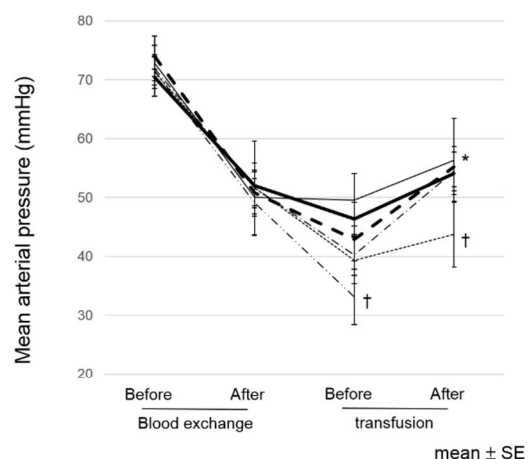
血し、大量出血・大量輸血による希釈性凝固障害を生起させた (血小板数が  $4 \times 10^4/\mu\text{L}$  以下となった)。

開腹し、肝臓に直径 5mm の穿孔性の損傷を作製した。肝臓穿孔部位に対して 4Fr 尿道バルーンカテーテルによって圧迫止血を行いながら、血小板 (PRP 15 mL/kg: ヒトで 10 単位相当)、H12-(ADP)-liposomes (20 mg/kg) と PPP (15 mL/kg) 混合液または PPP (15 mL/kg) を静脈内投与した。5 分後に尿道バルーンカテーテルを除去し、止血が達成されるまで経過観察した。止血が達成されたものについては、平均動脈圧を 50mmHg 以上にすることを目標に、HbV またはドナーからの濃厚赤血球を 10 ~ 20ml 輸血した。術前後の血液学的指標ならびに血液凝固指標を比較するとともに、急性期の生命予後と血行動態への影響を比較した。生存率は Wilcoxon signed rank test によって比較した。2 群間の統計は Student's *t* test を使用した。他は ANOVA を使用し、Bonferroni post-hoc test を行った。いずれも  $p < 0.05$  を統計的有意とした。

## 4. 研究成果

上記の血液交換過程で血小板数は  $4 \times 10^4/\mu\text{L}$  以下になり、凝固指標は測定限界以下に達した。Hb濃度も 6g/dl 前後で Hct 値も 20% 前後となり、Hct 値の減少から算出される出血量は循環血液量の 25% 以上となり、米国外科医学会が策定した Advanced trauma life support での出血性ショックのクラス分類<sup>7</sup>で class Ⅲ に至った。穿孔部からの出血量は止血に至るまでにさらに 15mL/kg に達し、平均動脈圧が 50mmHg 以下で、出血量は循環血液量の 40% 以上となりショック class Ⅳ に陥った。

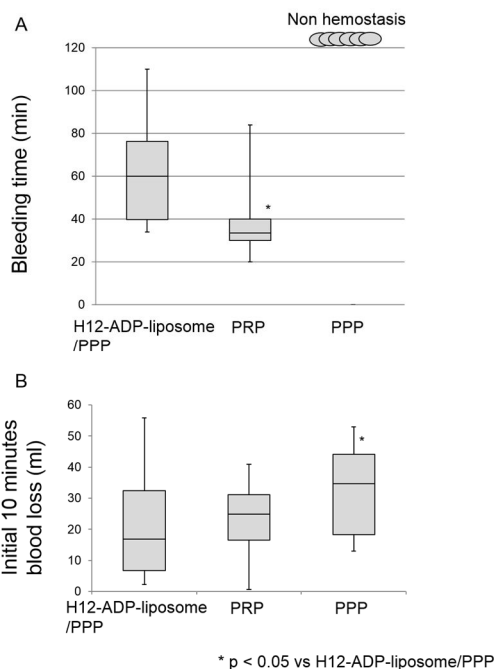
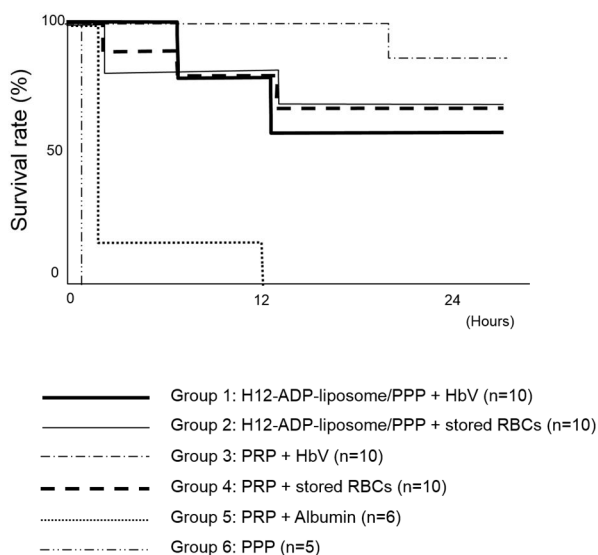
H12-(ADP)-liposomes/PPP を投与下群では、PRP を投与した群と同様に全例で止血に成功した。一方、PPP (血漿成分のみ) を



\*  $p < 0.05$  Final transfusion period vs. 25minutes after liver injury period (Group 3 and 4)  
†  $p < 0.05$  vs. other groups

- Group 1: H12-ADP-liposome/PPP + HbV (n=10)
- Group 2: H12-ADP-liposome/PPP + stored RBCs (n=10)
- - - Group 3: PRP + HbV (n=10)
- - - Group 4: PRP + stored RBCs (n=10)
- ..... Group 5: PRP + Albumin (n=6)
- ..... Group 6: PPP (n=5)

投与した群では止血ができず、全例失血死した。さらに、止血し得た家兎に対して、ドナー兎から赤血球輸血(ヒトで10単位に相当)、またはHbVを投与することによって、ショックから離脱し24時間後の生存率は60-70%に達した。これに対して、止血後にAlbumin投与をおこなったものはショック状態から離脱できず全例死亡した。



## 考察

歴史的に外傷性凝固障害は血小板や血漿を投与せずに晶質液および赤血球輸血を行ったことに起因している<sup>8</sup>。そして hemostatic resuscitation の根幹は、Damage control surgery、低血圧管理の許容、線溶管理、そしてなにより確実な止血である。換言すれば、晶質液や膠質液輸液による希釈性凝固障害を防止することである。

しかし、実際の外傷治療の現場では赤血球輸血のほかには新鮮凍結血漿の使用にとどまることが多いのが実情である。これはひとえに、血小板を輸血用として大量に準備・管理することが困難であることに由来している。即ち、新鮮凍結血漿や濃厚赤血球が凍結もしくは冷所保存により製造から1か月程度は使用が見込めるのに対して、血小板は22℃恒温での振盪保存を原則とし、さらにその使用期限が数日以内に限られ、安定的に補給することが難しいためである。実際、米軍の野戦病院の基本方針は、後方の医療施設からの濃厚血小板の補給はせずに全血を使用するか、または現場で成分献血を実施して血小板を準備し使用していることが多い。これは災害現場においても、病態の進行に応じた医療提供が難しくなり、病院到着前に出血性ショックに陥る点で共通した課題である。

Hemostatic resuscitation の実際として、鈍的肝損傷患者に対して Damage control resuscitation として血小板や血漿を投与しつつ輸液制限により平均動脈圧を50mmHg程度に維持し外科手術を行うことなく予後を改善した報告がある<sup>9</sup>。本研究においても、平均動脈圧が50mmHg以下の状況でH12-(ADP)-liposomes /PPPまたはPRP投与による止血を優先した。そして止血完了後にHbVまたはドナーからの赤血球輸血を行い、平均動脈圧を50-60mmHgとし再出血を防止できた。

## 結論

これらの人工血液は長期保存が可能でプレホスピタルでの使用にも適しており、大量出血の早期から投与することで外傷による出血性ショックと凝固障害を合併した治療困難な病態の救命率向上が期待できる。

## <引用文献>

1. Bolliger D. *Anesthesiology*. 2010.
2. Meisner A, et al. *Transfus Med Hemother*. 39:73-84. 2012
3. Holcomb JB. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010:465-9. 2010.
4. Takeoka S, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 773-9. 2003.
5. Hagsisawa K, et al. *Transfusion* 55:314-25. 2015
6. Sakai H, et al. *Shock* 31: 192-200. 2009
7. Committee on Trauma: *Advanced Trauma Life Support Manual*. Chicago: American College of Surgeons; 1997:103-112.
8. Pham HP, et al. *Br J Anaesth* 111 Suppl 1:i71-82. 2013.
9. Shrestha B, et al. *J Trauma Acute Care Surg* 78:336-41. 2015.

## 5. 主な論文発表等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Hagsisawa K, Kinoshita M, Takikawa M, et al. Combination therapy using fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes and hemoglobin vesicles for trauma-induced massive hemorrhage in thrombocytopenic rabbits. *Transfusion*. 2019 Jul 1. doi: 10.1111/trf.15427. [Epub ahead of print] 査読有
2. Hagsisawa K, Kinoshita M, Takase B, et al. Efficacy of resuscitative transfusion with hemoglobin vesicles in the treatment of massive hemorrhage in rabbits with thrombocytopenic coagulopathy and its effect on hemostasis by platelet transfusion. *Shock* 50(3): p.324-330, 2018.09 査読有
3. 萩沢康介, 木下学 出血性ショックと凝固障害を人工血液で制御する *Shock* (日本ショック学会雑誌) 2018 32(2) 14 17 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. Hagsisawa K, Kinoshita M. Intraosseous Transfusion with Hemoglobin Vesicles for Severe Hemorrhagic Shock Rabbits. AHA Scientific Session 2018, Chicago IL, 平成 30 年 11 月 11 日 ポスター *Circulation*. 138(Issue Suppl 2): p.A189, 2018.11
2. 萩沢康介, 木下学, 酒井宏水 HbV の経骨髄投与により出血性ショックを制御する 第 25 回日本血液代替物学会年次大会 平成 30 年 10 月 18 日 口頭 旭川 人工血液 26 巻 1 号 P20
3. Hagsisawa K, Kinoshita M, Sakai H. Intraosseous Transfusion with Hemoglobin Vesicles for severe Hemorrhagic Shock Rabbits. Military Health System Research Symposium 2018, Kissimmee FL, 平成 30 年 8 月 22 日 ポスター
4. Hagsisawa K, Kinoshita M. Efficacy of resuscitative transfusion with hemoglobin vesicles in the treatment of massive hemorrhage in rabbits with thrombocytopenic coagulopathy and its effect on hemostasis by platelet transfusion. 41st Annual Conference on Shock, Scottsdale AZ, 平成 30 年 6 月 11 日 ポスター
5. 萩沢康介 出血性ショックと凝固障害を人工液で制御する 第 95 回日本生理学会 平成 30 年 3 月 29 日 ポスター 高松 *J Physiol Sci* 67 巻 S17
6. 萩沢康介, 木下学, 多喜川真人, 武岡真司, 酒井宏水, 宮崎裕美, 斎藤大蔵「出血性ショックと凝固障害を人工血液で制御する」第 24 回日本血液代替物学会シンポジウム 平成 29 年 12 月 8 日 東京 人工血液 24 巻 1 号 P22
7. Hagsisawa K, Kinoshita M. Complete Blood Substitute for Massive Transfusion in Thrombocytopenic and Hemorrhagic Shock Rabbits. American Heart Association 2017 Resuscitation Science Symposium 平成 29 年 11 月 13 日 口頭 Anaheim, CA
8. 萩沢康介, 木下学「出血性ショックと凝固障害を人工血液で制御する」第 32 回日本ショック学会シ



- ンポジウム 平成 29 年 9 月 30 日 岐阜
9. 萩沢康介、木下学、酒井宏水、斎藤大蔵「人工酸素運搬体(HbV)は出血性ショックに凝固障害を合併する病態においていかに機能するか？」第 1 回日本集中治療学会関東支部学術集会シンポジウム 平成 29 年 7 月 29 日 大宮
  10. Hagisawa K, Kinoshita M. Hemoglobin Vesicles and Fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, Adenosine Diphosphate-encapsulated Liposomes Rescue Rabbits from Hemorrhagic Shock with Trauma-Induced Coagulopathy. 40th Annual Conference on Shock, 平成 29 年 6 月 6 日 ポスター Fort Lauderdale, FL Shock 2017; 46: 56
  11. Hagisawa K, Kinoshita M. Fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated Liposomes Rescue Mice from Lethal Blast Lung Injury via Adenosine Signaling. 2<sup>nd</sup> Japan-US Technical Information Exchange Forum on Blast Injury, 平成 29 年 4 月 16 日 口頭 Tokyo, Japan (Invited) Final program p87
  12. 萩沢康介、木下学、佐藤俊一、鈴木英紀、多喜川真人、武岡真司、斎藤大蔵「大量出血性凝固障害を H12-ADP-liposome で制御する - 最適の病院前治療に向けて - 」第 23 回日本血液代替物学会シンポジウム・人工血小板製剤の適応と臨床試験 平成 28 年 11 月 25 日 東京 人工血液 24 巻 1 号 P22
  13. Hagisawa K, Kinoshita M. Resuscitation by transfusion with Hemoglobin Vesicles in Trauma Hemorrhagic Shock / Coagulopathy Rabbits. American Heart Association 2016 Resuscitation Science Symposium 平成 28 年 11 月 13 日 口頭 New Orleans, LA
  14. Hagisawa K, Kinoshita M, Miyawaki H. Fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated Liposomes Rescue Mice from Lethal Blast Lung Injury via Adenosine Signaling. The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies 平成 28 年 10 月 4 日 ポスター Tokyo
  15. Hagisawa K, Kinoshita M, Miyawaki H. Fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated Liposomes Rescue Mice from Lethal Blast Lung Injury via Adenosine Signaling. MHSRS2016 平成 28 年 8 月 16 日 ポスター Orlando, FL
  16. Hagisawa K, Takikawa M, Kinoshita M. Prehospital transfusion with H12-ADP-liposome instead of conventional Platelet concentrate. 39th Annual Conference on Shock, 平成 28 年 6 月 12 日 ポスター - Austin, TX Shock 2016; 45: 56

## 6 研究組織

### (1) 研究代表者

萩沢 康介 (HAGISAWA, Kohsuke)  
防衛医科大学校・医学教育部専門課程・助教  
研究者番号: 25462843

### (2) 研究分担者

木下 学 (KINOSHITA, Manabu)  
防衛医科大学校・医学教育部専門課程・准教授  
研究者番号: 70531391

武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号: 20222094

鈴木 英紀 (SUZUKI, Hidenori)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30158977

酒井 宏水 (SAKAI, Hiromi)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70531391