

ハミルトン酸素化装置、門脈圧測定用圧測定装置およびリザーバーはサーモスタットにより制御された恒温キャビネットの中に設置されている。ハミルトン酸素化装置は常に95% O₂、5% CO₂ガスが吹き込まれた。単離肝臓の再灌流はKBSに10 micromol/hrでタウロコール酸を加えて行い、コンピューターにより、門脈圧が常に5 cmH₂Oとなるように制御した。単離肝臓はレザーバーの上に静置し、120分間再灌流された。

PFCは本研究班研究協力者である神戸学院大学薬学部薬効学福島昭二講師より供給されたもので、50%パーフルオロトリブチルアミン (FC-43) 50%を含有するエマルジョンであり、エマルジョンは精製卵黄レシチン (2.4%) からなり、表面修飾を0.12%のポリエチレングリコール (PEG) リン脂質により行っている。PFC製剤投与時は、電解質濃度をKBSと同様となるよう補正し、さらにその膠質浸透圧が水と同様であることから、ウシ血清アルブミン2%を加えた。なおPFC製剤は初期肝臓灌流用KBSと虚血ユニット内のKBSに添加し、再灌流液には添加しなかった。

本研究では再灌流までの処置を以下の3群に分けて行った (n=1~3)。第一群：KBSのみでPFCを添加しなかった群、第二群：PFCを20%添加し、KBSを95% O₂、5% CO₂ガスでバブリングしなかった群、第三群：PFCを20%添加し、KBSを95% O₂、5% CO₂ガスでバブリングした群。

肝障害の評価は以下の方法で行った。1) 門脈流量：5 cmH₂Oの定圧灌流における流量を計測し、持続的にモニターした。2) 胆汁排出量：胆管よりの再灌流120分間の胆汁排出量を計測した。3) LDH放出量：再灌流30、60、90、120分後の灌流液中のLDHを測定した。4) 酸素消費量：再灌流30、60、90、120分後の流入液および流出液中の酸素分圧を計測し、肝臓の酸素消費量を算出した。

C. 研究結果

再灌流90分後の門脈流量は、第一群：0.75 ± 0.06(SD) ml/min/g liver、第二群：0.56 ml/min/g liver、第三群：1.17 ± 0.30 ml/min/g liverとなり、第三群で有意の流量増加が認められ、肝血管抵抗の減少が確認された。胆汁排出は三群とも確認されなかった。再灌流120分後のLDH放出量は、第一群：4334 ± 365(SD) IU/L/g liver、第二群：3732 IU/L/g liver、第三群：3939 ± 470 IU/L/g liverとなり、PFC製剤使用群で減少傾向にあった。再灌流90分後の酸素消費量は、第一群：

0.399 ± 0.024(SD) micromol/min/g liver、第二群：0.268 micromol/min/g liver、第三群：0.639 ± 0.195 micromol/min/g liverとなり、第三群で酸素消費の増加が確認された。

D. 考察

本研究の結果より、常温下においては本研究で用いた50%PFC製剤を20%添加し、さらにそれを常時酸素化した条件下では、灌流停止による虚血および再灌流に基づく種々のストレスに起因する障害から、肝細胞をある程度保護することが可能であることが明かとなった。本モデルは温粗血モデルであるため、肝細胞の障害および薬剤によるその保護作用が出現し易いモデルと考えられる。実際の生体肝移植においては、肝臓を4°Cで保存することから、実際の臨床をシミュレートした実験としては、今後まず低温下において同様な実験を度施行する必要があると考えられる。また臨床実地上、酸素のバブリングは装置等の問題から煩雑であり、輸送時に実施することは回避すべきものと思われるので、十分に酸素化したPFC添加液を保護液として用いた場合の肝保護効果を評価すべきであろう。これらの実験は平成13年度に遂行予定である。PFC製剤が生体肝移植時に実用化される可能性に関してはこれらを評価し、さらに大動物モデルで実験を繰り返した後に議論すべきと思われる。その際には、当然PFC製剤の安全性および医療経済的実用性がさらに検討される必要がある。

本研究で用いたPFC製剤はPEG修飾が施されている。PEG修飾はPFC製剤の免疫的ステルス性を高め、また血小板活性化を減弱させる作用をもたらすとされているが、それらが肝臓保護作用に寄与するか否かに関しては、PEG修飾を施していない製剤との比較検討が必要であり、現在実験を遂行中である。

本研究の結果は、脳死肝移植時の肝臓保護のみならず、脳死心移植時の心臓保護に応用できる可能性がある。脳死心はdonorから掲出後4時間以内に移植されなければならない、時間の制限が移植施設等を決定する重要なファクターとなっており、さらに交通事情等によりもし移送の遅延が起これば、recipientにも不利益が生ずる危険が高い。もしPFC製剤の使用により保存時間の延長がもたらされるならば、その臨床的有用性は非常に大きいと考えられる。今後、移植心保護へのPFC製剤の応用についても検討がなされるべきと思われる。

E. 結論

PFC製剤が肝移植時のdonor肝細胞保護に応用可能か否かを検討するため、ラット単離肝虚血再灌流モデルを用い、PFC製剤を混合した臓器灌流液が、灌流停止放置状態の摘出肝臓に酸素を供給することより、灌流停止時の肝細胞保護および再灌流に基づく種々のストレスによる肝細胞障害からの保護が可能か否かを検索した。その結果、37°C条件下において50%PFC製剤を20%添加し、さらにそれを酸素でバブリングした溶液中で単離肝を保存することより、虚血および再灌流による障害から肝細胞を保護することが可能であること明かとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Furukawa H, Suzuki T, Jin MB, Yamashita K, Taniguchi M, Magata S, Ishikawa H, Ogata K, Masuko H, Shimamura T, Fukai M, Hayashi T, Fujita M, Nagashima K, Omura T, Kishida A, Todo S: Prolongation of canine liver allograft survival by a novel immunosuppressant, FTY720; effect of monotherapy and combined treatment with conventional drugs. *Transplantation* 69: 235- 241, 2000
2. Yamada A, Konishi K, Cruz GLE, Takehara M, Morikawa M, Nakagawa, I, Murakami M, Abe T, Todo S, Uede T: Blocking the CD28-B7 T-Cell Costimulatory Pathway Abrogates the Development of Obliterative Bronchiolitis in a Murine Heterotopic Airway Model. *Transplantation* 69: 743-749, 2000
3. Yokota R, Fukai M, Shimamura T, Suzuki T, Watanabe Y, Kishida A, Furukawa H, Hayashi T, Todo S: A novel hydroxyl radical scavenger, nicaraven, protects the liver from warm ischemia and reperfusion injury. *Surgery* 127: 661-669, 2000.
4. Fujita M, Furukawa H, Hattori M, Todo S, Nagashima K: Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT). *Modern Pathology* 13: 152-157, 2000
5. 藤堂省：始まった脳死肝移植：これからの課題. *外科治療* 82: 179-184, 2000
6. 古川博之、藤堂省：腹部多臓器移植. ドナー手術の手技と要点. *医学のあゆみ* 193: 927-929, 2000
7. 古川博之、岸田明博、大村孝志、神山俊哉、松

下通明、藤堂省：日本における生体および脳死肝移植の適応とシステムの問題点. *北海道医学雑誌* 75: 219-222, 2000

8. 古川博之、岸田明博、大村孝志、越前谷勇人、藤堂省：小腸移植におけるドナーの問題点. *今日の移植* 13: 59-64, 2000
9. 大村孝志、岸田明博、古川博之、松下通明、藤堂省：成人に対する生体肝移植 右葉移植. *外科* 62: 61-63, 2000
10. 岸田明博、古川博之、大村孝志、松下通明、藤堂省：生体肝移植の手技 成人生体肝移植術における病的肝摘出の手技とその工夫 *手術* 54: 1211-1216, 2000
11. 野本亀久雄、大島伸一、大和田隆、小中節子、藤堂省：ドネーションを考える～臓器移植法施行後のドネーションを考える～ *Trends & Topics in Transplantation* 11: 3-8, 2000
12. 古川博之、嶋村剛、陳孟鳳、神山俊哉、山下健一郎、松下通明、藤堂省：肝移植の現況と展望 *臨床異種肝移植 肝胆膵* 41: 939-947, 2000
13. 大村孝志、崎浜秀康、前田好章、岸田明博、古川博之、藤堂省：臓器移植のなかでの腎移植. *肝臓移植の現況 臨床透析* 16: 63-68, 2000

2. 学会発表

1. Satoru Todo: "Experience with LDLT in Japan," *Controversies in Transplantation*, Breckenridge, Colorado, U.S.A., 2000.3.18.
2. Satoru Todo: "Evolution of Clinical Intestinal Transplantation," *The 59th Scientific Meeting of the Surgical Association R.O.C.*, 2000.3.25.
3. 藤堂 省：我が国における生体及び脳死体肝移植の現状と展望. 第100回日本外科学会総会、東京、2000.4.14.
4. 藤堂 省：移植医療の将来に向けて－肝臓移植の現状－. 第86回日本消化器病学会総会新潟市民公開講座、新潟市、2000.4.22.
5. 藤堂 省：臓器移植と21世紀. 第73回日本細菌学会総会、札幌市、2000.5.30.
6. 藤堂 省：肝臓移植；過去、現在、未来. 第88回日本泌尿器科学会総会、札幌市、2000.6.8.
7. 藤堂 省：Adult to adult LDLT in Japan. 第1回日韓肝移植シンポジウム、京都市、2000.7.16.
8. 藤堂 省：特別シンポジウム「21世紀の消化器外科－移植外科－」. 第55回日本消化器外科学会総会、宮崎市、2000.7.20.
9. 藤堂 省：21世紀に向けての移植外科学の挑戦. 第27回日本マイクロサージャリー学会学術集

- 会、札幌市、2000.8.25.
10. 藤堂 省：人工酸素運搬体の臓器移植への応用の可能性. 第7回日本血液代替物学会年次大会、札幌市、2000.9.8.
11. 藤堂 省：移植医療を推進するために－21世紀にすべきこと－. 第36回日本移植学会総会市民公開講座、岐阜市、2000.10.11.
12. 藤堂 省：臨床肝臓移植の現況と今後の問題. 第12回日本生命倫理学会年次大会、旭川市、2000.11.3.
13. 藤堂 省：我が国の成人生体肝移植の動向について. 第8回臨床肝臓カンファレンス、東京、2000.11.18.
14. 齋藤孝則、蒲池浩文、大久保 尚、西川和孝、藤本哲也、村林 俊、三田村好矩、松下通明、藤堂 省：早期形成型ラット肝細胞混合スフェロイド機能維持に向けたコラーゲン環境の検討. 第12回代用臓器研究会、2000.2.10. 札幌
15. 西川和孝、西川雄大、西田 仁、大倉隆介、西村紳一郎、齋藤孝則、藤本哲也、大久保 尚、蒲池浩文、松下通明、藤堂 省、下村政嗣：多孔性ポリマーフィルムを利用した肝細胞の形態および機能制御. 第12回代用臓器研究会、2000.2.10. 札幌
16. 敦賀陽介、皆川のぞみ、崎浜秀康、大村孝志、岸田明博、古川博之、松下通明、清水道生、藤堂 省：劇症肝不全に対する生体部分肝移植. 第72回北海道外科学会、2000.2.12. 札幌
17. 松下通明、陳 孟鳳、谷口雅彦、神山俊哉、中川隆公、中山雅人、大村孝志、岸田明博、古川博之、藤堂 省：肝切除・肝移植からみた肝微小循環の意義. 第27回日本集中治療医学会総会、2000.3.3. 名古屋、日本集中治療医学会雑誌 7(Suppl):100、2000
18. 増子佳弘、玉置 透、田中三津子、梅津貴史、村井紀元、内田泰至、此枝義記、三浦玲子、横田亘弘、川村明夫：ラット小腸におけるL-glutamine誘導性heme oxygenase-1とアポトーシスの検討. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000
19. 石川博人、谷口雅彦、陳 孟鳳、鈴木友己、嶋村 剛、堀内彦之、眞方紳一郎、緒方賢司、益子博幸、深井 原、岸田明博、古川博之、藤堂 省：肝温阻血・再灌流生涯におけるcyclic nucleotides, cAMP及びcGMPの意義. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000
20. 小西勝人、村上正晃、野村 克、山下健一郎、柳田尚之、越前谷勇人、竹原めぐみ、大村孝志、古川博之、岸田明博、上出利光、藤堂 省：CTLA4Ig及びFTY720の慢性拒絶反応の抑制効果. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000
21. 陳 孟鳳、嶋村 剛、谷口雅彦、鈴木友己、緒方賢司、眞方紳一郎、石川博人、深井 原、大村孝志、岸田明博、古川博之、藤堂 省：生体侵襲による微小循環生涯の機構とその制御：肝温阻血モデルを用いた検討. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000
22. 古川博之、岸田明博、大村孝志、松下通明、藤堂 省：成人における生体および脳死肝移植の適応・システムの問題. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000
23. 嶋村 剛、谷口雅彦、陳 孟鳳、鈴木友己、眞方紳一郎、緒方賢司、石川博人、益子博幸、大村孝志、岸田明博、古川博之、松下通明、藤堂 省：生体肝移植における術中門脈血流量測定の意義. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000
24. 深井 原、鈴木友己、陳 孟鳳、谷口雅彦、嶋村 剛、眞方紳一郎、堀内彦之、緒方賢司、石川博人、飯田潤一、益子博幸、岸田明博、古川博之、藤堂 省：イヌ腎、肝移植におけるFTY720のCyclosporin及びFK506との併用療法としての効果. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000
25. 大久保 尚、松下通明、蒲池浩文、高橋 学、西川和孝、齋藤孝則、藤本哲也、藤堂 省：ハイブリッド型人工肝開発に向けた混合スフェロイド早期作製法の検討. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000
26. 谷口雅彦、眞方紳一郎、石川博人、陳 孟鳳、鈴木友己、嶋村 剛、深井 原、堀内彦之、緒方賢司、益子博幸、岸田明博、古川博之、藤堂 省：肝温阻血再灌流障害における内因性adenosineの関与とその細胞内signal transductionの解明. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000
27. 齋藤正信、伊東沙織、高田譲二、林 隆章、徳光幸子、藤堂 省：ATPによる肝細胞死と類洞内皮細胞との相互作用による肝細胞保護効果. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外

科学会雑誌 101(Suppl): 2000

28. 高田譲二、山下健一郎、越前谷勇人、武田圭佐、斎藤正信、大村孝志、岸田明博、古川博之、藤堂省：肝虚血再灌流障害におけるアンジオテンシⅡの役割. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000

29. 緒方賢司、陳 孟鳳、谷口雅彦、鈴木友己、嶋村 剛、眞方紳一郎、堀内彦之、石川博人、深井原、北河徳彦、岸田明博、古川博之、藤堂 省：肝阻血・再灌流障害におけるⅡ型ホスホリパーゼA2(Ⅱ型PLA2)阻害剤の効果の検討. 第100回日本外科学会総会、2000.4.12-14. 東京、日本外科学会雑誌 101(Suppl): 2000

30. 緒方俊郎、陳 孟鳳、益子博幸、乗富智明、谷口雅彦、嶋村 剛、鈴木友己、古川博之、松下通明、藤堂 省：微小循環と類洞内皮機能からみた術中門脈圧及び組織・門脈・肝動脈血流測定的重要性. 第55回日本消化器外科学会総会. 2000.7.20. 宮崎, 日本消化器外科会誌 33(7): 184, 2000

31. 大久保 尚、松下通明、蒲池浩文、西川和孝、藤本哲也、斎藤孝則、藤堂 省：早期形成型ラット肝細胞混合スフェロイド機能維持に向けたゲル環境の検討. 第38回人工臓器学会. 2000.9.29. 四日市

32. 今井 敦、折茂達也、石川博人、萩原邦子、嶋村 剛、古川博之、藤堂 省：北海道大学第一外科における生体肝移植. 第87回日本消化器病学会北海道支部例会. 2000.9.30. 札幌

33. 古川博之、藤堂 省：肝癌に対する肝移植の適応について. 消化器病・消化器内視鏡学会合同シンポジウム. 2000.10.1. 札幌

34. 岸田明博、古川博之、嶋村 剛、石川博人、崎浜秀康、神山俊哉、松下通明、藤堂 省：劇症肝不全に対する肝移植の適応. 第36回日本移植学会総会.

2000.10.11-13, 岐阜, 移植 35: 138, 2000

35. 山下健一郎、野村 克、越前谷勇人、柳田尚之、小林篤寿、竹原めぐみ、小西勝人、岸田明博、古川博之、藤堂 省：新規免疫抑制剤SDZ RADのラット肝移植における効果. 第36回日本移植学会総会. 2000.10.11-13, 岐阜, 移植 35: 187, 2000

36. 古川博之、岸田明博、嶋村 剛、崎浜秀康、神山俊哉、松下通明、藤堂 省：当院における生体部分肝移植33例の経験. 第36回日本移植学会総会. 2000.10.11-13, 岐阜, 移植, 35: 222, 2000

37. 嶋村 剛、谷口雅彦、陳 孟鳳、鈴木友己、緒方賢司、石川博人、緒方俊郎、岸田明博、古川博之、藤堂 省：生体肝移植における門脈、肝動脈血流量とグラフト機能不全の関係. 第36回日本移植学会総会. 2000.10.11-13, 岐阜, 移植, 35: 232, 2000

38. 越前谷勇人、山下健一郎、竹原めぐみ、小西勝人、岸田明博、古川博之、上出利光、藤堂 省：CTLA4Ig遺伝子導入法によるラット同所性小腸移植拒絶制御. 第36回日本移植学会総会. 2000.10.11-13, 岐阜, 移植 35: 264, 2000

39. 陳 孟鳳、神山俊哉、嶋村 剛、鈴木友己、谷口雅彦、緒方俊郎、岸田明博、古川博之、藤堂 省：死体肝移植ドナーに見られる術後高ビリルビン血症の検討. 第36回日本移植学会総会. 2000.10.11-13, 岐阜, 移植, 35: 319, 2000

40. 古川博之、松下通明、藤堂 省：肝細胞癌に対する生体肝移植の経験. 第4回日本肝臓学会大会. 2000.10.25-26. 神戸, 肝臓 41 Suppl(2): A328, 2000

41. 陳 孟鳳、嶋村 剛、古川博之、藤堂 省：血管作動性物質と肝虚血再灌流障害. 第6回北海道活性酸素・フリーラジカル研究会. 2000.11.25. 札幌

分担研究報告書

臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究

分担研究者 剣物 修 北海道大学大学院医学研究科教授

研究要旨 平成10年度より本研究班で開発し創製した新規パーフルオロケミカル（PFC）製剤（PFC濃度40%）が臨床的に有用であるか否かを検索するため、ヒューマンサイエンス振興財団招へい申請外国人研究者照屋純博士らと共に小児における人工心肺使用時をシュミレートした実験系を計画し、ビーグル犬を用いた大動物実験を行った。人工心肺を装着し、その結果回路内へのプライミングボリュームが必要であるため血液の希釈が生じてヘマトクリット（Ht）が約30%となるコントロール群、さらに手術中の出血をシュミレートして瀉血を行いHtを約15%とした貧血群、貧血群にPFC製剤輸血を少量投与（血中濃度1.5%）および中等量投与（血中濃度15%）した群において、全身の酸素供給が十分におこなわれるか否かを比較検討した。その結果、PFC製剤を最終血中濃度として約15%となるべく使用することにより、貧血群で生ずる乳酸濃度上昇、血液酸性化が回避され、失血による全身循環・代謝の悪化を改善可能であることが明らかとなった。臨床的には小児等で人工心肺を使用した手術を行う際、出血が起きた場合にPFC製剤を使用することにより同種輸血を回避できる可能性が示唆された。今後、この血中濃度のPFCが血小板活性化等の副作用を惹起していないか、またPFC濃度を増した新たな製剤で有効血中濃度を減少可能か否か等をさらに検討する必要があると思われる。

A. 研究目的

同種輸血は最近の遺伝子技術を駆使してもウイルス感染症やGVHDなどを完全には回避できず、100%安全な治療法とはいえない。外科手術時、特に開心術では人工心肺の使用により血液希釈が起こり同種輸血が必要となることがしばしばある。無輸血手術を拡大するために術前に患者本人から貯血を行うなどの方法により輸血回避が試みられており、自己血輸血は外科手術においてルーチンな方策となっているが、患者の術前状態に問題がある場合や循環血液量の少ない小児症例などでは不可能な症例が多く、いまだ無輸血手術施行率は低い状態である。パーフルオロケミカル（PFC）は酸素供与能を有し、PFCを脂質エマルジョンに溶解したPFC製剤は人工血液として利用可能である。実際米国においては、第2世代PFC製剤ともいうべきOxygent[®]が、現在自己血輸血時のさらなる同種血輸血回避を目的として治験第3相を行っている。しかるに、同剤では冠動脈バイパス手術時の輸血回避目的に使用した治験において、脳卒中が増加し、治験が中断している。

その理由として、PFC製剤による血小板凝集活性化の関与が疑われる。本研究班では、平成10年度より新規PFC製剤の開発研究を開始し、現在プロトタイプのパFC製剤を保有している。今回の検討では、同製剤が臨床的に有用であるか否かを検索する目的で、ビーグル犬を用い、小児における人工心肺使用時をシュミレートした実験系で、コントロール群、貧血群、PFC製剤輸血（少量投与および中等量投与）群において、全身の酸素供給が十分におこなわれるか否かを比較検討した。

なお、本研究の立案は本研究班分担研究者北海道大学大学院医学研究科循環病態内科佐久間一郎講師、東北大学大学院医学系研究科環境保健仲井邦彦助教授、神戸学院大学薬学部製剤学福島昭二講師、およびヒューマンサイエンス振興財団招へい申請外国人研究者米国ノースウエスタン大学輸血部長照屋純博士、さらに研究協力者北海道大学大学院医学研究科循環病態外科今村道明助手と共に行い、動物実験は循環病態外科今村道明助手のグループと共同して遂行した。

B. 研究方法

実験動物として体重約10 kgの雌性ビーグル犬を使用した。A群：コントロール群として単純に人工心肺を回した群（プライミングボリュームが約550 ml必要であり、人工心肺中のヘマトクリット（Ht）は約30%となる）、B群：貧血群として手術時の出血をシュミレートし、瀉血を行ってHtを約15%とした群、C群：貧血（Ht15%）にPFC製剤を最終血中濃度約1.5%となるように加えた群、D群：貧血（Ht15%）にPFC製剤を最終血中濃度約15%となるように加えた群（各群n=3~5）とした。麻酔導入はケタミン5 mg/kg+ イソゾール10 mg/kg+ レベタン0.001 mg/kgで行い、適時イソゾール追加により麻酔を維持した。気管挿管後、人工呼吸管理を呼吸回数12/min、分時換気量10-15 L/kgで行い、動脈血CO₂を40 mmHgほどに設定した。

モニター項目としては心電図、大腿動脈圧、中心静脈圧、尿量、膀胱温をモニターした。

人工血液は神戸学院大学薬学部薬剤学教室より提供された40%PFC溶液であり、内容はパーフルオロオクチルブロマイド（PFOB）28%、FO-9982 12%を精製卵黄レシチン（2.4%）に溶解し、さらにポリエチレングリコール（PEG）としてDSPE-50H（0.12%）を用いてPEG修飾を行ったものを使用した。本製剤の平均粒子サイズは約170 nmほどであった。投与量は循環血液量+プライミングボリューム550mlから計算し、循環血液中PFC濃度が1.5%（C群）もしくは15%（D群）となる量とした。また、D群ではPFC製剤の浸透圧が水と同様であることから、膠質浸透圧を保つ目的で、最終濃度が以下の値であるバッファー溶液に溶解して投与した（NaCl 0.8%, KCl 0.03%, CaCl₂ · 2H₂O 0.03%, MgCl₂ · 6H₂O 0.02%, NaHCO₃ 0.2%, Glucose 0.2%, ウシ血清アルブミン 3%）。

人工心肺使用プロトコールは、装置として人工肺 polistan safe mini+テルモ人工心肺回路SS（プライミングボリューム550ml）+ECUM回路を使用し、大腿動脈送血（メドトロニック社製10Fr.）と経総頸静脈右房脱血（メドトロニック社製12Fr.）を行った。人工心肺はアセテートリンゲル液でプライミングし、カニューレーション前にヘパリン300単位/kgを投与した。B、C、D群では人工心肺開始前に約900 gの瀉血を行い、Htが15%程となるようにした後人工心肺を開始した。C、D群ではこの際PFC製剤およびバッファー溶液をリザーバー内に投与した。A群ではそのまま開始し、流量80

ml/kg/minで灌流して膀胱温34°Cまで冷却した。冷却後2時間灌流を維持し、2時間後にB、C、D群では瀉血した血液を輸血し、その後回路中の血液をECUMで限外濾過して除水し、体内に戻した。同時に膀胱温36°Cまで復温した。A群では回路中の血液の除水、体内への返却と復温を行った。復温後、各群とも人工心肺をweaningし、その後8時間経過観察を行った。

採血ポイントとしては、1)人工心肺開始前、2)人工心肺開始直後、3)膀胱温34°C到達時、4)人工心肺維持1時間後、5)人工心肺維持2時間後、6)膀胱温36°C復温後、7)人工心肺終了後、8)終了4時間後、9)終了8時間後、の計9ポイントで動脈血採血を行った。測定項目としては、血液ガス分析、乳酸値、S100蛋白（中枢障害のマーカー）を測定した。

C. 研究結果

最高乳酸値はA群で1.4 ± 0.5 mmol/L、B群で5.0 ± 3.3 mmol/L、C群で6.1 ± 1.2 mmol/L、D群で2.9 ± 0.6 mmol/Lとなった。A群では乳酸値は一定であったが、B群、C群では瀉血後人工心肺を回している間、徐々に乳酸値の上昇が生じ、その上昇傾向はC群で顕著であった。D群では乳酸値の上昇は軽度に抑えられた。また、B群およびC群ではpHの低下が著明であり、特にC群で全身の浮腫の増加傾向が認められた。

S100蛋白は全群において上昇が認められなかった。

D. 考察

本研究では、本研究班で開発した新規PFC製剤が、実際の心臓外科手術をシュミレートした状態で酸素供与能を発揮し、臨床的に使用することに耐える物質であるか否かを検討した。本研究のA群（コントロール）は体重10 kgほどの小児に人工心肺を装着して開心術を施行し、しかも手術時に出血がなかった状態をシュミレートしたモデルである。この群では今回用いた規格の人工心肺を装着した後HTは30%ほどとなり、以後低温下でその値を2時間継続させたが、嫌気性代謝の指標である乳酸値の上昇が起こらず、また血液ガスが酸性に陥ることもなく経過した。

しかし、実際の心臓手術時にはある程度以上の出血は不可避である。そのため人工心肺装着後の出血をシュミレートしたB群を検討した。B群では人工心肺開始前の瀉血によりHtを約15%とし、その状

態で人工心肺を回し、低温下で2時間経過させたが、徐々に乳酸値の上昇と血液の酸性化が生じた。

C群はB群と同様に人工心肺開始前の瀉血でHtを約15%とした後、循環血液中PFC濃度が1.5%となるようにPFC製剤を投与した群である。この状態では、乳酸値はむしろB群より上昇し、血液の酸性化も進んだ。同様のPFC濃度の投与シュミレーションはOxygent[®]を用い、われわれが今回用いた実験条件より軽い条件でのものが報告されており、少なくとも動物の状態を悪くする結果は認められていない。C群では膠質浸透圧を補正する意味でのアルブミンの投与が行われず、そのため血液膠質浸透圧の低下が起こり、PFC粒子が血管外に漏出した可能性が高い。また、本研究で用いたPFCの濃度は40%であり、その酸素供与能は血液中に5%存在した状態で、常温の血漿溶存酸素と同等と計算される。従って、前述のOxygent[®]を用いた実験では、そのPFC濃度は60%であることから、われわれが使用した製剤の1.5倍の酸素保持能を有していたとしても、1.5%ほどの血中濃度で実際に酸素供与が有効に行われていたかは疑わしいと思われる。

C群でPFC少量投与の有効性が認められなかったことから、われわれは中等量のPFC投与の必要性を予想し、D群においてPFCの最終濃度が15%となるようにPFC製剤を投与するとともに、血液膠質浸透圧への影響を考慮して補正用のバッファーとともに投与を行った。その結果、B、C群で認められた貧血に伴うと考えられる乳酸値の産生および血液の酸性化が有意に抑制された。従って、現在の製剤であっても、15%程度の最終濃度となるまで投与量を増加させれば、大量の出血による15%程のヘマトクリットの低下を伴う貧血状態にも対応可能であることが示唆された。

本研究では、貧血に伴う中枢神経障害をモニターする目的でS100蛋白を測定したが、各群とも有意の変化を示さなかった。本研究程度の貧血では、イヌにおいてはS100蛋白上昇を認めるほどの中枢神経障害は惹起されることが示唆された。

現在Oxygent[®]は第二世代のPFC製剤としてPFC濃度60%を達成し、臨床第3相治験を行ってきたが、冠動脈バイパス手術時に同種輸血回避目的にPFCを使用した治験において、脳卒中が増加したため治験が中断している。Oxygent[®]に関しては以前より、投与後に血小板減少が認められたことから、血小板活性化とそれに引き続く血栓発生が危惧されていたが、今回のイベントもその理由による可能性が高いとされている。本研究班で開発中の製剤は、現在

PFC濃度を40%まで上昇させたものであるが、PEG修飾を加え、血小板活性化を可能な限り抑制させることを企図して創製した。本製剤でもある程度血中濃度を上昇させれば、手術時の失血に対応でき、自己血輸血の不足状態において同種輸血回避に使用可能であることが示唆された。しかし、PFC製剤の血中濃度を上昇させることにより、Oxygent[®]で問題となったように血小板活性化を始めとする副作用の可能性が増大することも確かである。本実験系では、採血ポイントで採血した動脈血について、現在血液凝固系、血清補体価、炎症性サイトカイン、血液生化学等の検索をすべく検体を集め、測定準備中である。また、現在の実験をさらに繰り返し、各群の動物数を増加させて確実なデータを取得するとともに、実験施行時の血小板凝集能検索を予定している。

PFC製剤の投与量を減らし、しかも効果的な組織酸素供給を可能とするためには、PRF製剤の溶存PFC濃度を増加させる方策も可能である。現在、さらにPFC濃度を増加させ、しかも安定な新製剤の創製を北海道大学大学院医学研究科循環病態内科北畠顕教授、佐久間一郎講師、東北大学大学院医学系研究科環境保健仲井邦彦助教授とともに神戸学院大学薬学部製剤学福島昭二講師に依頼し、共同開発中である。新製剤が創製された場合には、今回の検討と比較することを予定している。

E. 結論

ビーグル犬を用い、小児での人工心肺使用手術時の出血をシュミレートし、本研究班で創製した新規PFC製剤による同種輸血回避の可能性を検索した実験系で、PFC製剤を最終血中濃度として約15%となるべく使用することにより、失血による全身循環・代謝の悪化を改善できることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujii H, Fujii S, Togashi H, Yoshioka M, Nakai K, Satoh H, Sakuma I, Kenmotsu O, Kitabatake A. Attenuation of hypothermia-induced platelet activation and platelet adhesion to artificial surfaces in vitro by modification of hemoglobin to carry S-nitric oxide and polyethylene glycol. *Thromb Res* 2000; 100: 519-528
2. Naoyuki Matsuda, Yuichi Hattori, Satoshi Gando, Satoko Watanuki, Osamu Kemmotsu, Morio Kanno: Differential gene transcriptional regulation of Gi isoforms and G5 protein

- expression in diabetic rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361: 53-60, 2000
3. Yuichi Hattori, Naoyuki Matsuda, Atushi Sato, Satoko Watanuki, Hiroshi Tomioka, Morio Kanno: Predominant contribution of the G protein-mediated mechanism to NaF-induced vascular contraction in diabetic rats: association with an increased level of Gq α expression. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 761-768, 2000
4. Satoshi Gando, Satoshi Nanzaki, Yuji Morimoto, Shigeyuki Kobayashi, Osamu Kemmotsu: Out-of-hospital cardiac arrest increases soluble vascular endothelial adhesion molecules and neutrophil elastase associated with endothelial injury. *Intensive Care Med* 26: 38-44, 2000
5. Yuji Morimoto, Yoshiko Morimoto, Osamu Kemmotsu, Satoshi Gando, Takaki Shibano, Hirochika Sikama: The effect of calcium channel blockers on cerebral oxygenation during tracheal extubation. *Anesth Analg* 91: 347-352, 2000
6. Yuji Morimoto, Yoshiko Morimoto, Jun Nishihira, Osamu Kemmotsu, Takaki Shibano, Satoshi Gando, Hirochika Sikama: Pentobarbital inhibits apoptosis in neuronal cells. *Crit Care Med* 28: 1899-1904, 2000
7. T.Kitta, N.Shinohara, H.Shirato, Hiroshi Totsuka, T.Koyanagi: The treatment of chronic radiation proctitis with hyperbaric oxygen in patients with prostate. *BJU International* 85: 372-374, 2000
8. Hidehiko Amenomori, Shigeyuki Sasaki, Yuji Morimoto, Satoshi Gando, Osamu Kemmotsu, Osamu Kemmotsu: Phosphodiesterase III inhibitor olprinone chlorate is not significantly removed by continuous venovenous hemodiafiltration. *ASAIO Journal* 2000, 635-638, 2000
9. 森本裕二、剣物 修、早川峰司: 周術期肺塞栓の原因と発生頻度. *呼吸と循環* 48: 9, 875-881, 2000
10. 森本裕二、岸野吏志、佐々木重幸、丸藤 哲、剣物 修、今村道明、村下十志文、安田慶秀: 乳幼児の急性腎不全に対する持続腹膜透析時のテイコプラニン薬物動態. *新薬と臨床* 49: 12, 1227-1230, 2000
2. 学会発表
1. 藤井 聡、藤井 ひとみ、仲井邦彦、佐久間一郎、剣物 修、北畠 顕: SNO-PEG-Hb の血小板に及ぼす影響: 血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーティング等臨床応用に向けての基礎的検討. 第7回日本血液代替物学会年次大会. 2000.9.8. 札幌. *人工血液* 8: 82, 2000
2. 菅原 武、佐久間一郎、藤井 聡、北畠 顕、富樫廣子、吉岡充宏、剣物 修、仲井邦彦、佐藤 洋: 各種ヘモグロビン誘導体の血小板への影響: s-ニトロソ-ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビンの人工酸素運搬体としての有用性の検討. 第4回北海道血栓・血小板研究会. 2001.1.26. 札幌
3. 菅原 武、佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井 聡、剣物 修、吉岡充宏、佐藤 洋、北畠 顕: 各種ヘモグロビン誘導体の肝微小循環系への影響: s-ニトロソ-ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビンの人工酸素運搬体としての有用性の検討. 第26回日本微小循環学会総会. 2001.2.15. 倉敷

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ	文献
Hiroko Togashi et al.	S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycol-conjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat	Moncada S Wilkund P Gustaffson L Higgs EA	The Biology of Nitric Oxide Part 7	Portland Press	London	2000	23	3
Ichiro Sakuma et al.	Nitric oxide scavenging effects of hemoglobin injected intravenously into spontaneously diabetic rats on blood pressure and platelet aggregation	Moncada S Wilkund P Gustaffson L Higgs EA	The Biology of Nitric Oxide Part 7	Portland Press	London	2000	75	4
Sakanoue J et al.	Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the polyethylene-glycol-conjugated hemoglobin	Swartz H Dunn J	Oxygen transport to tissues XXII	Kluwer Academic Plenum Publisher	New York	2001	in press	2
仲井邦彦 佐久間 一郎	S-ニトロソ-PEG-ヘモグロビンの製法と解析：酸素運搬体としての応用	吉村哲彦	生体内一酸化窒素(NO)実験プロトコール	共立出版株式会社	東京	2000	280-284	8

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年	文献
Fujii H et al.	Attenuation of hypothermia-induced platelet activation and platelet adhesion to artificial surfaces in vitro by modification of hemoglobin to carry S-nitric oxide and polyethylene glycol	Thromb Res	100	519-528	2000	1
Nakai K et al.	Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material	Int J Artif Organs		in press	2001	5
仲井邦彦他	パーフルオロカーボン (PFC) : 第2世代PFCによる挑戦. 8(1): 43-51, 2000	人工血液	8	43-	2000	6
佐久間一郎	NOの功罪—進化および臨床からみた知見—.	日本薬理学雑誌	115	311	2000	8
仲井邦彦他	人工酸素運搬体開発の課題	血液・免疫・腫瘍	6	29-34	2001	9
照屋純他	赤血球代替物の臨床応用の可能性	人工血液	9	in press	2001	10
佐久間一郎他	s-ニトロソヘモグロビンの基礎と臨床	THE LUNG perspectives	9	191-194	2001	11

20000487

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。