

平成 14 年度に施行予定である。

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。心臓は 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、交通事情等により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 製剤応用の検討を予定している。

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、低温下で PFC 製剤を混合した保存液が、灌流停止放置状態の摘出肝臓に酸素を供給することにより、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、4℃条件下において 50%PFC 製剤を 5% 添加し、37℃にて再灌流した条件下では、明確な保護作用は確認されなかった。今後、添加濃度を上昇させて、再検討する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuko H, Jin MB, Horiuchi H, Suzuki T, Taniguchi M, Shimamura T, Fukai M, Magata S, Ogata K, Ishikawa H, Fujita M, Nagashima K, Furukawa H, Todo S: Protective effect of angiotensin II

type I receptor antagonist, CV-11974, on ischemia and reperfusion injury of the liver. *Transplantation* 71(8): 1034-1039, 2001

2. Ogata K, Jin MB, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Kitagawa N, Magata S, Fukai M, Ishikawa H, Ono T, Furukawa H, Fujita M, Todo S: Attenuation of ischemia and reperfusion injury of canine livers by inhibition of type II phospholipase A2 with LY329722. *Transplantation* 71(8): 1040-1046, 2001
 3. 藤堂省：我が国の成人生体肝移植の動向、*医学と薬学* 45(5)：782-787, 2001
 4. 藤堂省：特集 高度先進医療と保険財政 肝移植は経済的評価からも効果的である、*日本医事新報* 4026: 93, 2001
 5. 真船直樹、小林邦彦、木村亜沙美、岸田明博、古川博之、藤堂省：血中抗アルギナーゼ自己抗体測定 of 肝移植マーカーとしての臨床応用、*消化器と免疫* 37(2000):116-120, 2001
 6. 古川博之、嶋村剛、陳孟鳳、神山俊哉、松下通明、藤堂省：特集肝移植手術のコツと術後管理 II. 血行再建 3. 脳死肝移植における門脈再建、*外科* 63(11):1306-1311, 2001
 7. 嶋村剛、長佐古良英、菊地弘展、陳孟鳳、古川博之、藤堂省：特集肝移植手術のコツと術後管理 I. ドナー肝切除 1. 脳死ドナーからの全肝切除、*外科* 63(11):1277-1282, 2001
2. 学会発表
 1. 陳孟鳳、尾形俊郎、鈴木友己、谷口雅彦、嶋村剛、古川博之、藤堂省：

- 「肝微小循環と凝固機能からみた GV/SV ratio 40%以上の必要性：ビーグル犬肝切除を用いた実験的根拠」第 101 回日本外科学会、4 月 11-13 日、仙台、日本外科学会雑誌 102: 299, 2001
2. 高田譲二、陳 孟鳳、武田圭佐、桜井経徳、昆 泰寛、砂原正男、高田尚幸、嶋村 剛、古川博之、藤堂 省：「局所レニン・アンギオテンシン系(local RAS)の肝虚血再灌流障害における役割」第 101 回日本外科学会、4 月 11-13 日、仙台、日本外科学会雑誌 102: 303, 2001
 3. 桜井経徳、陳 孟鳳、武田圭佐、砂原正男、高田尚幸、嶋村 剛、古川博之、藤堂 省：「血管拡張性ペプチド・アドレノメデュリンの肝虚血再灌流障害に対する保護効果」第 101 回日本外科学会、4 月 11-13 日、仙台、日本外科学会雑誌 102: 304, 2001
 4. 石川博人、陳 孟鳳、緒方俊郎、嶋村剛、古川博之、藤堂 省：「肝虚血・再灌流障害モデルにおける amrinone の再灌流後投与の検討」第 101 回日本外科学会、4 月 11-13 日、仙台、日本外科学会雑誌 102: 305, 2001
 5. Tsunenori Sakurai, Maeng Bong Jin, Kiesa Takeda, Tsuyosi Shimamura, Hiroyuki Furukawa, Miri Fujita, Satoru Todo. Adenomedullin, a novel vaso dilative peptide, attenuates ischemia reperfusion injury of the liver. *Transplant* 2001, May 12-16, Chicago, USA.
 6. Keisa Takeda, Maeng Bong Jin, Tsunenori Sakurai, Tsuyoshi Shimamura, Hiroyuki Furukawa, Miri Fujita, Satoru Todo. An novel inhibitor of RHO-associated protein kinase, Y-27632, ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury. *Transplant* 2001, May 12-16, Chicago, USA.
 7. 緒方俊郎、陳 孟鳳、砂原正男、高田尚幸、山下健一郎、嶋村 剛、古川博之、松下通明、藤堂 省：「マウス大量肝切除後、肝不全に対する TNF- α 阻害剤の効果」第 37 回日本移植学会総会、12 月 15-16 日、東京、移植 36: 168, 2001
 8. 武田圭佐、陳 孟鳳、桜井経徳、深井原、緒方俊郎、中山雅人、嶋村 剛、藤田美俐、古川博之、藤堂 省：「ROCK 阻害薬 (Y-27632) のラット肝虚血再灌流障害に対する効果」第 37 回日本移植学会総会、12 月 15-16 日、東京、移植 36: 169, 200
 9. 桜井経徳、陳 孟鳳、武田圭佐、中山雅人、緒方俊郎、嶋村 剛、藤田美俐、古川博之、藤堂 省：「血管拡張性ペプチド・アドレノメデュリンの肝虚血再灌流障害に対する保護効果」第 37 回日本移植学会総会、12 月 15-16 日、東京、移植 36: 267, 2001
 10. 中山雅人、陳 孟鳳、桜井経徳、武田圭佐、緒方俊郎、嶋村 剛、古川博之、藤堂 省：「PDE3 阻害剤オルプリノンの肝虚血再灌流障害に対する効果」第 37 回日本移植学会総会、12 月 15-16 日、東京、移植 36: 268, 2001

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 劔物 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、血管作動性ペプチド（ブラジキニン）活性化、補体活性化が回避され、失血・人工心肺による全身循環・代謝・炎症反応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。しかしながら、フィブリノーゲンやプロトロンビン時間には人工血液は影響しなかったが、血中濃度 15%の PFC では活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が認められた。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た。

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^R 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 PFC 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 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。なお、鎮痛目的としてレペタン 0.001 mg/kg を麻酔導入直前に静脈内投与した。

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 (92.6ml/kg) +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、全群で血液ガス分析、乳酸値、S100 蛋白 (中枢障害のマーカー)、A、B、D 群で白血球数、血管作動性ペプチド (ブラジキニン、ヒスタミン)、血清補体価、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノーゲン、フィブリン/フィブリノーゲン分解産物 (FDP)、プラスミノーゲンを測定した。

倫理面への配慮

実験開始に当たっては、実験計画を北海道大学医学部動物実験委員会に提出し、承認を得て実験を行った。

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。

人工心肺使用の影響による炎症反応の指標として、白血球数、ブラジキニン、ヒスタミンおよび血清補体価を検討した結果、最高白血球数は A 群で $9.7 \pm 3.9 \times 1000/\mu l$ 、

B群で $9.8 \pm 6.1 \times 1000/\mu\text{l}$ 、D群で $9.6 \pm 3.7 \times 1000/\mu\text{l}$ であり各群に有意差は認められなかった。最高血漿ブラジキン濃度に関してはA群で $8.2 \pm 1.3\text{ng/ml}$ 、B群で $18.4 \pm 3.5\text{ng/ml}$ 、D群で $15.0 \pm 2.2\text{ng/ml}$ であり、A群と比較するとB、D群では著名に上昇していたが、B群と比較してD群では有意に減少していた。最高血漿ヒスタミン濃度に関しては、A群 $0.8 \pm 0.3\text{ng/ml}$ 、B群 3.0 ± 0.5 、D群 $2.3 \pm 0.8\text{ng/ml}$ であり、各群に有意差は認められなかった。血清補体価に関してはA群 $19.7 \pm 1.7 \times 50\text{U/ml}$ 、B群 $29.8 \pm 5.0 \times 50\text{U/ml}$ 、D群 $22.2 \pm 1.8 \times 50\text{U/ml}$ であり、B群と比較してD群では有意に減少していた。

凝固系を検討した結果、フィブリノーゲンはA群 $276.8 \pm 17.4\text{mg/ml}$ 、B群 $253.5 \pm 30.2\text{mg/ml}$ 、D群 $326.8 \pm 48.4\text{mg/ml}$ でありA、BおよびD群に有意な差は認められなかった。プロトロンビン時間 (PT) に関してはA群 $13.5 \pm 1.9\text{sec}$ 、B群 $21.2 \pm 2.5\text{sec}$ 、D群 $20.7 \pm 3.5\text{sec}$ でありB、CおよびD群に有意差は認められなかった。しかしながら、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) A群 $300 \pm 0\text{sec}$ 、B群 $300 \pm 0\text{sec}$ 、D群 $161.1 \pm 57.2\text{sec}$ であり、D群では他群と比較して有意に短縮した。

一方線溶系の指標としたFDPやプラスミノーゲン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^R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^R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タとも投与を行った。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ないことが示唆された。

一般的に人工心肺を使用することにより炎症反応（白血球数上昇、ブラジキニン活性化、ヒスタミン活性化および補体活性化等）が誘起され、これが小児の開心術後の全身性浮腫や capillary leak syndrome を引き起こすと考えられているが、本研究では白血球数および血漿ヒスタミン濃度には差を示さなかった。しかしながら、D群では血漿ブラジキニン濃度および血清補体価を有意な減少が認められたため、人工心肺を使用した手術に人工血液は有効であると

示唆された。

また一般に人工心肺を使用すると異物との接触により凝固系が活性化されるが、本研究ではフィブリノーゲンおよび PT には影響を示さなかったが、D群において APTT の短縮が認められたため、PFC の血中濃度を上昇させると人工心肺使用時に異物との接触により内因性の凝固系の活性化が生じたと示唆された。本研究に使用した PFC 製剤を人工心肺に使用する時には血栓形成を惹起する可能性があること示唆された。

本研究では、線溶系をモニターする目的で FDP およびプラスミノーゲンを測定したが、各群とも有意の変化を示さなかった。本研究で使用した PFC 製剤は線溶系を惹起しないと示唆された。

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^R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、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頭教授、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、および人工心肺による炎症反応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: Differnetioal gene treanscriptional regulation of Gi isoforms and G5 protein expression in diabetic rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Phamacol* 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 vasxular 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 uascular endothelial adheison 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、劔物 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、劔物 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
 11. 藤井 聡、藤井ひとみ、富樫廣子、吉岡充宏、佐久間一郎、仲井邦彦、佐藤洋、北島 顕、劔物 修：ヘモグロビン系人工酸素運搬体を用いた抗血栓性材料の開発。循環制御 23(1): 31-34, 2002
 12. 藤井 聡、藤井ひとみ、富樫廣子、吉岡充宏、仲井邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、劔物 修、北島 顕：ヘモグロビン系人工酸素運搬体の血小板に及ぼす影響と人工材料としての臨床応用の可能性。人工血液 10: 2002 in press
2. 学会発表
 1. 菅原 武、佐久間一郎、藤井 聡、北島 顕、富樫廣子、吉岡充宏、劔物 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
 2. 菅原 武、佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井 聡、劔物 修、吉岡充宏、佐藤 洋、北島 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
 3. 菅原 武、佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井 聡、藤井ひとみ、吉岡充宏、佐藤 洋、劔物 修、北島 顕：各種ヘモグロビン誘導体静注の肝臓・腎臓への影響：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22回日本循環制御医学会総会。2001.5.11. 徳島

4. 藤井 聡、福島昭二、藤井ひとみ、佐久間一郎、仲井邦彦、劔持 修、西尾琢也、竹内由和、北島 顕：
Perfluorocarbon(PFC)製剤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の可能性. 第8回日本血液代替物学会. 2001.9.4. 東京

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 小田切 優樹 熊本大学薬学部教授

研究要旨 ビアスパンは臓器移植時の臓器冷却保存液として最も広く使用されている。臓器保存時間をより延長させるためには、冷却条件においても臓器細胞に酸素供給が必要であることが示唆されており、ビアスパンに酸素運搬能を与える添加物の探索は重要である。輸血などを代替する酸素運搬物質として、ヘモグロビン誘導体とパーフルオロカーボンエマルジョン（以下PFCエマルジョン）が従来検討されてきたが、ヘモグロビン誘導体は冷却条件では酸素運搬能はほとんどなく、従って、ビアスパンに添加する候補としてPFCエマルジョンがあげられる。しかし、予備的な検討において、PFCエマルジョンとビアスパンを混合すると凝集することが確かめられた。そこで、生体成分であるアルブミンおよび $\alpha 1$ 酸性糖タンパクの保護コロイド作用により、凝集抑制効果が得られないか検討することを目的とした。その結果、PFC(FC43)エマルジョンとビアスパンの凝集を抑制し、アルブミンあるいは $\alpha 1$ 酸性糖タンパクの添加は有効であり、特に $\alpha 1$ 酸性糖タンパクにおいてその効果が強かった。今後、高濃度のPFCエマルジョンで凝集抑制効果について検討を要する。

パーフルオロカーボンエマルジョンと臓器保存液ビアスパン混合時の凝集に対するアルブミンおよび $\alpha 1$ 酸性糖タンパクの凝集抑制効果

1. リン脂質分散液とビアスパン混合時の凝集に対するアルブミン、および $\alpha 1$ 酸性糖タンパクの影響

A. 研究目的

PFCエマルジョンの調製にはレシチン

が使用されているが、レシチン分散液とビアスパンの混合により凝集が観察される。そこで、種々のレシチンにつき、ビアスパンとの凝集性を比較し、さらにアルブミンあるいは $\alpha 1$ 酸性糖タンパクの添加による凝集抑制効果を検討した。

B. 研究方法

下記の4種のレシチンを1.0 W/V%で注射用水にスターラーで分散後、高圧ジェット流型乳化機（DeBEE 2000）でさらに分散

し、レシチン分散液を調製した。これらのレシチン分散液とビアスパンを1：1で混合し、凝集性を観察した。次に、高濃度に溶解したアルブミン溶液あるいは α 1酸性糖タンパク溶液をレシチン分散液に添加したのち、ビアスパンと1：1で混合し、凝集性を観察した。

レシチンNC61：水素添加大豆レシチン（フォスファチジルコリン（PC）含量75%）

NC21：水素添加大豆レシチン（フォスファチジルコリン（PC）含量98%）

NL55：精製卵黄レシチン（フォスファチジルコリン（PC）含量75%）

NC10S：精製卵黄レシチン（フォスファチジルコリン（PC）含量90%以上）

C. 研究結果

4種のいずれのレシチン分散液においても、ビアスパンと1：1で混合することで凝集が観察された。代表として図1にNC61の状態を示した。フォスファチジルコリン（PC）含量の高いレシチンでもビアスパンと凝集する事から、凝集はレシチンの主成分であるフォスファチジルコリン（PC）によると考えられる。レシチンの他の成分（特にフォスファチジルエタノールアミン）との凝集性も問題であるが、今後の検討事項である。

4種のレシチンのうちNC61は、PC含量の高いレシチンに比較し乳化安定性が高く、また水素添加された飽和脂肪酸で構成されているため化学的安定性も高く、これまでPFCエマルジョン調製に中心的に使用されてきた。そこでこれ以降の検討では、NC61を用いて検討した。

図2にNC61分散液にアルブミンあるいは α 1酸性糖タンパクを数種の濃度で添加した後、ビアスパンと混合した場合の、混合直後および冷所保存24時間後の状態を示した。アルブミンは、0.5%以上の濃度で凝集を抑制し、24時間後でも凝集抑制効果が得られた。 α 1酸性糖タンパクは1%濃度で若干の凝集抑制効果を示したが、24時間後には1%でも凝集した。

2. PFC(FC43)エマルジョンとビアスパン混合時の凝集に対するアルブミン、および α 1酸性糖タンパクの影響

A. 研究目的

酸素運搬能はビアスパン中に添加するPFCエマルジョンの濃度に依存する。単純計算では、最終濃度としてPFCが5W/V%増加するごとに、酸素溶解量はビアスパンのみと比較し、2倍増加する。従って添加物としてのPFCエマルジョンのPFC濃度は高濃度が必要であり、現時点では、50W/V%のPFCエマルジョンをビアスパンに1：9～2：8程度で添加することを想定している。しかし、50W/V%のPFCエマルジョンの調製には、多量のPFCとレシチンが必要であり、高額を要する。そこで、10W/V%のPFCエマルジョンを調製し、ビアスパンと1：1で混合し（最終PFC濃度：5W/V%）、凝集性を検討した。また、PFCとして、パーフルオロトリブチルアミンを主成分とするFC43を用いた。

B. 研究方法

PFC(FC43)とレシチン（NC61）の

割合は10 : 1 (w/w)とした。所定量のレシチン (NC61) をスターラーを用いて注射用水に分散させ、さらに高压ジェット流型乳化機 (DeBEE 2000) でレシチン分散液を調製した。引き続き、高压ジェット流型乳化機を用い、デュアルフィード法でPFC (FC43) を乳化し (粗乳化)、その後、乳化機を組み換えた後、本乳化した (乳化方法の詳細は省く)。調製されたPFC (FC43) エマルジョンに、あらかじめ高濃度に溶解したアルブミン溶液、あるいは α 1酸性糖タンパク溶液を添加し、その後、ビアスパンと1 : 1で混合し凝集性を観察した。

C. 研究結果

PFC (FC43) エマルジョンのみとビアスパンを混合しても、直後には顕著な凝集は観察されなかったが、24時間後には凝集が下部に沈殿していた (図3 : アルブミンおよび α 1酸性糖タンパクの濃度0の場合)。

D. 考案

50% PFCエマルジョンを用いた以前の検討では、凝集は顕著であったことから、PFC分散粒子の界面に分布したレシチンはビアスパンとは凝集を起こさず、界面以外に存在するレシチン (製造法からリポソームの形態と考えられる) がビアスパンと凝集すると考えられる。高濃度のPFCエマルジョンの調製にはより多量のレシチンが必要であり、エマルジョン中でのリポソームの共存は必須であることから、PFCとレシチンの量の調整と乳化方法の最適化のみでは、ビアスパンとの凝集は抑制でき

ないと考えられる。

PFC (FC43) エマルジョンにアルブミン溶液あるいは α 1酸性糖タンパク溶液を添加しても全く変化はなかった。アルブミン溶液あるいは α 1酸性糖タンパク溶液添加後に、ビアスパンを混合した直後および4℃保存24時間後の状態を図3に示した。

アルブミン溶液の添加は、0.1%以下では凝集を促進したが、0.5%以上の添加では凝集を24時間後も抑制した。0.5%以上の濃度での凝集抑制効果は、保護コロイド効果によると考えられる。0.1%以下での凝集促進の原因としては、アルブミンによるPFC (FC43) エマルジョン粒子からのレシチンの引き抜きが、保護コロイド作用よりも強いため、エマルジョンが不安定化されたことが一つの仮説として考えられるが、今後の検討事項である。

α 1酸性糖タンパクは、0.01%~1.0%において凝集抑制効果を24時間後まで示した。アルブミンに比較して低濃度でも凝集抑制効果を示したのは、レシチンなどの引き抜き効果を α 1酸性糖タンパクが持たないためとも考えられるが、これも今後の検討事項である。

E. 結論

PFC (FC43) エマルジョンとビアスパンの凝集抑制のために、アルブミンあるいは α 1酸性糖タンパクの添加は有効であり、特に α 1酸性糖タンパクでその効果が強かった。今後、高濃度のPFCエマルジョンで凝集抑制効果を確認する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Interaction Mechanism between Indoxyl Sulfate, a Typical Uremic Toxin Bound to SiteII, and Ligands Bound to SiteI of Human Serum Albumin. T. Sakai, M. Otagiri et al. *Pharm. Res.*,18(4)520-524(2001)
 2. Stability of a Cisplatin-Chondroitin Sulfate A Complex in Plasma and Kidney in Terms of Protein Binding. J.S. Zhang, M. Otagiri et al. *Biol. Pharm. Bull.*, 24(8)970-972(2001)
 3. Effect of Oxidative Stress on the Structure and Function of Human Serum Albumin. M. Anraku, M. Otagiri et al. *Pharm. Res.*,18(5),632-639(2001)
 4. Conformational Stability and Warfarin-binding Properties of Human Serum Albumin Studied by Recombinant Mutants. H. Watanabe, M. Otagiri et al. *Biochem. J.*, 357, 269-274(2001)
 5. FK506 (tacrolimus) Increases α 1-Acid Glycoprotein Expression in Liver and Primary Cultured Hepatocytes. K. Shimoishi, M. Otagiri et al. *E. J. Pharmacol.*, 420, 91-95(2001)
 6. Clarithromycin Up-regulates α 1-Acid Glycoprotein. Expression in Liver and Primary Cultured Hepatocytes. T. Komori, M. Otagiri et al. *Biochem. Pharmacol.*,62,1391-1397(2001)
 7. In Vitro and In Vivo Properties of Recombinant Human Serum Albumin from *Pichia Pastoris* Purified by a Method of Short Processing Time. H. Watanabe, M. Otagiri et al. *Pharm. Res.*,18(12) 1775-1781 (2001)
 8. High-performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection of Penbutolol and Its Hydroxylated Metabolite in Rat Plasma. K. Funato, T. Imai, K. Nakashima, M. Otagiri, *J Chromatogr. B Biomed Sci Appl.* 757(2):229-235(2001)
 9. Stereoselective Protein Binding of Alprenolol in the Renal Diseased State. H. Imamura, M.Otagiri et al. *Chirality*, 14(2002), in press
 10. Major Role of Organic Anion Transporter 3 in the Transport of Indoxil Sulfate in the Kidney. T. Deguchi , S. Ohtsuki, M. Otagiri et al. *Kidney. Int.*, (2002) ,in press
 11. Molecular-weight-dependent Pharmacokinetics and Cytotoxic Properties of Cisplatin Complexes Prepared with Chondroitin Sulfate A and C.J.S. Zhang, M. Otagiri et al. *Int. J. Pharmaceut.*, 233 , (2002) , in press
 12. Pharmaceutical Strategies Utilizing Recombinant Human Serum Albumin.(Review) V.T.G. Chuang , U. K-Hansen , M. Otagiri. *Pharm. Res.*, (2002) , in press
 13. Practical Aspects of the Ligand-binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. (Review) U. Kragh-Hansen, V.T.G. Chuang, M. Otagir. *Biol. Pharm. Bull.*, (2002) in press
2. 学会発表
 1. 今村 均、小森高文、丸山 徹、末永綾香、小田切優樹：塩基性薬物の立体選択的蛋白結合に及ぼす生理的及び病的要因モレキュラー・キラリティ. 2001

- 2001.6.7～8 大阪
2. 安楽 誠、山崎啓之、丸山 徹、高倉喜信、Ulrich Kragh-Hansen、小田切優樹：ヒト血清アルブミンの機能に及ぼす酸化の影響。第16回日本薬物動態学会年会 2001.10.17～19 神戸
 3. 松元一明、鋤本勝晃、西 弘二、丸山徹、末永綾香、小田切優樹： α 1-酸性糖蛋白分子上における薬物結合サイトの種差。第16回日本薬物動態学会年会 2001.10.17～19 神戸
 4. 中城圭介、渡邊博志、丸山 徹、棚瀬純男、小田切優樹：ヒト血清アルブミンの体内動態に及ぼす非酵素的糖化反応の影響。第16回日本薬物動態学会年会 2001.10.17～19 神戸
 5. 加峰弘毅、下石和樹、小森高文、甲斐広文、小田切優樹：クラリスロマイシンによるNFkB signaling pathwayの抑制機序と α 1-酸性糖蛋白質誘導作用との関連性について。第16回日本薬物動態学会年会 2001.10.17～19 神戸
 6. 西 弘二、齋藤史織、小田切優樹： α 1-酸性糖蛋白質の構造安定性評価。第23回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2001.11.8～9 熊本
 7. 出口恒夫、浅場 浩、大槻純男、高長ひとみ、細谷健一、堤 泰寛、小田切優樹、寺崎哲也：尿毒症物質 Indoxyl sulfate の腎及び血液脳関門輸送の分子機構。第23回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2001.11.8～9 熊本
 8. 末永綾香、鶴崎泰史、河野陽介、安楽誠、小田切優樹：ヒト血清アルブミンの安定性に及ぼす各種添加剤の影響。日本薬学会 第122年会 2002.3.26～28 千葉
 9. 原田大輔、安楽 誠、福田 光、原田久美子、内藤真策、末永綾香、小田切優樹：N-アセチルシステインとヒト血清アルブミンの共有結合体形成機構の解明。日本薬学会 第122年会 2002.3.26～28 千葉
 10. 安楽誠、高倉喜信、川井恵一、小田切優樹：酸化ストレスに対するヒト血清アルブミンのシステインとメチオニンの役割。日本薬学会 第122年会 2002.3.26～28 千葉
 11. 松元一明、西 勝英、入江徹美、小田切優樹：赤血球の変形能及び溶血に対する α 1-酸性糖蛋白質。日本薬学会第122年会 2002.3.26～28 千葉
 12. 西 弘二、齋藤史織、小田切優樹： α 1-酸性糖蛋白質の構造安定性について。日本薬学会 第122年会 2002.3.26～28 千葉
 13. 脇岡基樹、Victor Chuong Tuan Giam、小田切優樹：光アフィニティラベル法によるAGP分子上のフルニトラゼパム結合部位の同定。日本薬学会 第122年会 2002.3.26～28 千葉
 14. Victor Chuong Tuan Giam、小田切優樹：薬物と血清アルブミンとの相互作用研究における光アフィニティラベル法の有用性について。日本薬剤学会 第17年会 2002.3.29～31 静岡
 15. 松下貞治、安楽 誠、中城圭介、異島優、柳瀬純男、小田切優樹：ヒト血清アルブミンドメインの設計と評価。日本薬剤学会 第17年会 2002.3.29～31 静岡
 16. 香月正明、西 弘二、倉田徳章、小林

智、末永綾香、小田切優樹: α 1-酸性糖蛋白と UCN-01 との相互作用: 結合様式と結合サイトについて. 日本薬剤学会 第 17 年会 2002.3.29~31 静岡

17. 出口恒夫、堤 泰寛、高館 明、末永

綾香、小田切優樹: フロセミドの体内動態に及ぼす尿毒症物質 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid の影響. 日本薬剤学会 第 17 年会 2002.3.29~31 静岡

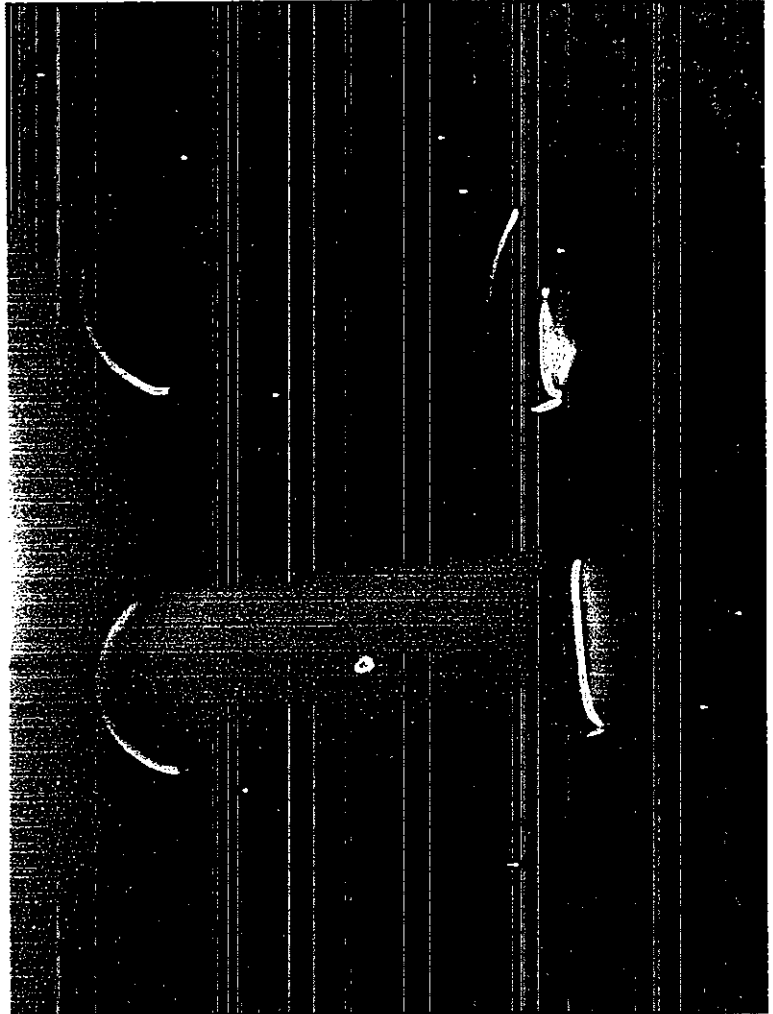
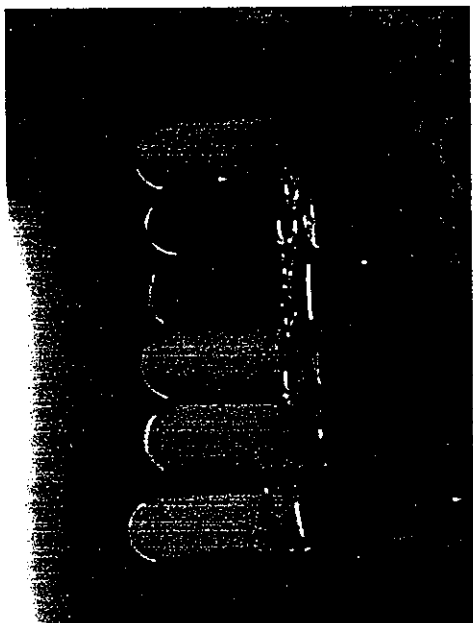


図1 レジチン(NC61)分散液とピアスパン混合での凝集

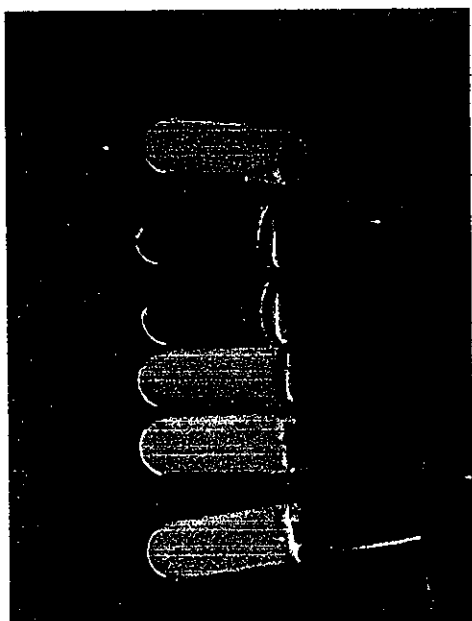
左:レジチン(NC61)分散液

右:レジチン(NC61)分散液+ピアスパン(1:1)

アルブミン添加: 左から 0%, 1.0%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%

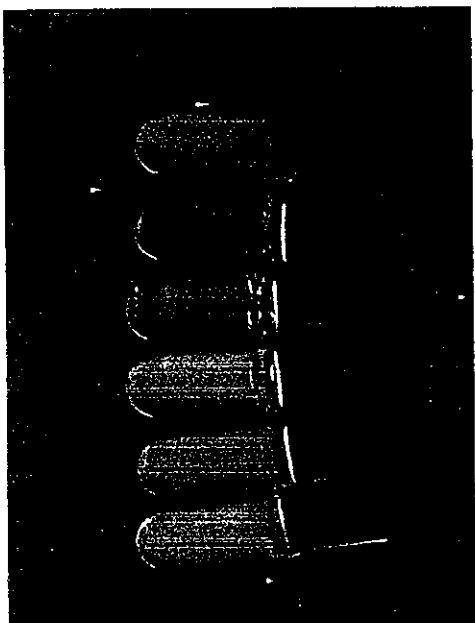


ピアスパン添加直後

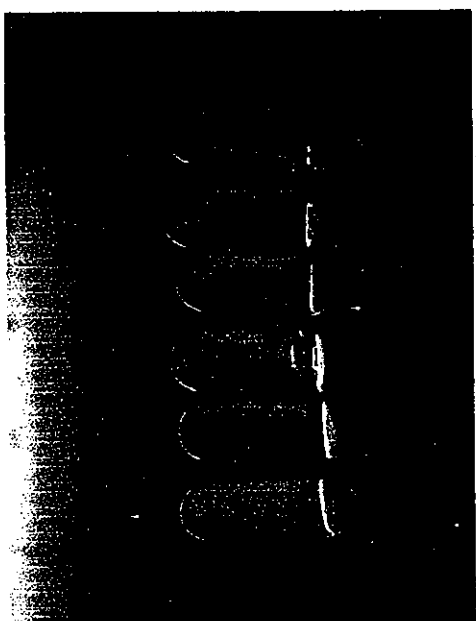


4°C 24時間保存後

α 1酸性糖タンパク添加: 左から 0%, 1.0%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%



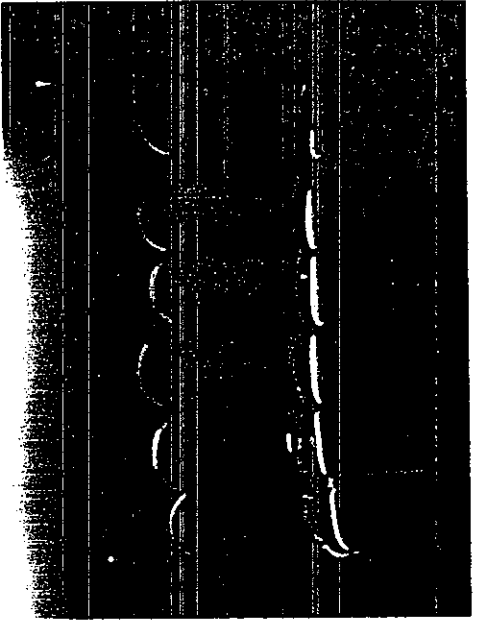
ピアスパン添加直後



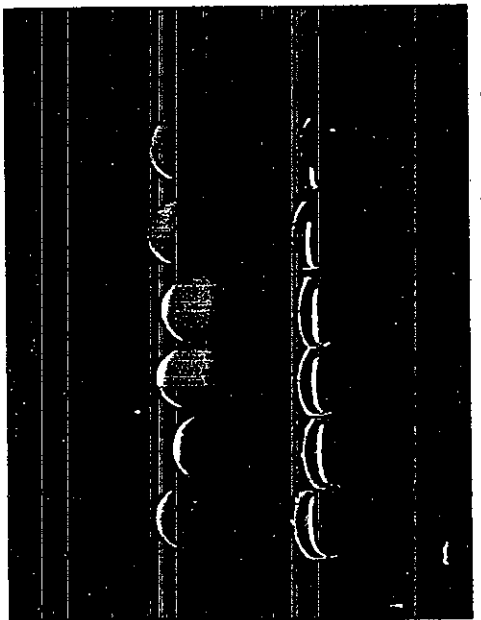
4°C 24時間保存後

図2 レジチン(NC-6)1分散液とピアスパン混合(1:1)での凝集に対するアルブミンおよび α 1酸性糖タンパク添加の影響

アルギニン添加: 左から 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1.0% (注: 図2と濃度逆順)

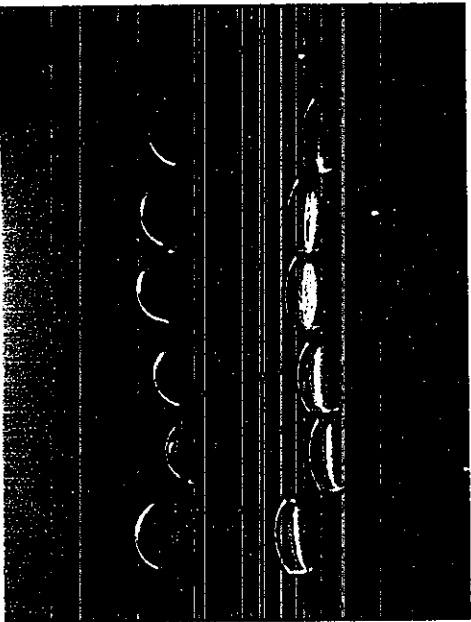


ピラスパン添加直後

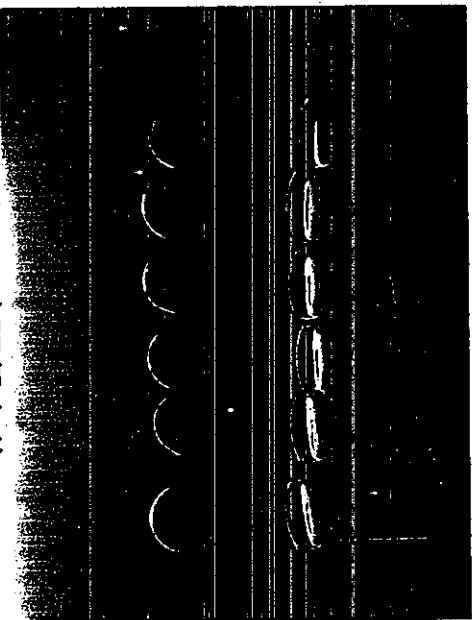


4°C 24時間保存後

α 1酸性糖タンパク添加: 左から 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1.0%



ピラスパン添加直後



4°C 24時間保存後

図3 PFC(FC43)エマルジョンとピラスパン混合(1:1)での凝集に対するアルギニンおよび α 1酸性糖タンパク添加の影響

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 並河和彦 麻布大学獣医学部助教授

研究要旨 本研究では人工赤血球の臨床応用を企図し、急性貧血を示す原虫感染症であるイヌ *Babesia gibsoni* 症へのポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン (PEG-Hb) の有用性を検討した。*Babesia gibsoni* 原虫を感染させたイヌが急性貧血を示した時点で、PEG-Hb を投与することにより臨床症状が改善されたことから、原虫感染症に起因する急性貧血の治療に対する PEG-Hb 製剤の臨床的有用性が確認された。

イヌの原虫感染症に伴う急性貧血への新規ヘモグロビン修飾体の臨床応用

A. 研究目的

人工酸素運搬体は血中半減期が短いため慢性貧血には適応が困難である。しかしながら、急性に貧血が進行する疾患、および免疫介在性溶血性貧血等の赤血球輸血が困難な疾患に対しての緊急避難的な応用が期待される。そこで本研究では、イヌの原虫感染症に伴う急性貧血に対して、本研究班で開発した新規 Hb 修飾体を臨床応用することを検討した。イヌの感染症の中で、*Babesia gibsoni* 感染症はわが国に常在し、急性貧血に陥るケースが多いが、その際有効な治療薬はなく、患畜が急性期を乗り越えて自立的に回復することで不顕性感染に向かう。すなわち、急性期の貧血を乗り越えることで治療も可能となる事情がある。

しかし獣医領域では輸血供給システムは必ずしも完全ではなく、供血犬を多数飼育し症例ごとに検査後同種血輸血を維持しているが、血液型不適合や消費量のばらつきなどの制限により企業化が難しく、現在緊急時への対応はなかなか困難である。そこで、本研究ではその貧血期を支援するために新規 Hb 修飾体を投与し、その結果治療効果が得られるか否かを検討することを目的とした。

B. 研究方法

実験用ビーグル犬に当研究室で継代している *Babesia gibsoni* 原虫感染血液を静脈内接種して感染させ、急性貧血を惹起した。貧血が顕著となる日から本研究班で開発した新規 Hb 修飾体であるポリエチレングリコール修飾(PEG)-Hb を体重 1kg あたり 1.5 g となるように、7.5%溶液を 20ml/kg