

pyridoxal 5'-phosphate 処理の工程を省略できたこと、高酸素親和性の Hb 製剤の安定性は悪くないこと（低酸素親和性の Hb 製剤の安定性はよくない）、などから良好であり、メト化率は常に 5%程度に抑えられた。酸素親和性の測定例を図に示した。

D. 考察

高酸素親和性の Hb 製剤の特徴を考察する。細動脈はその支配下の下流域における血流を制御する。その細動脈には酸素センサーが存在するとされ、細動脈の酸素濃度が毛細血管の血流を部分的に支配する。ここで低酸素親和性の Hb 製剤は、酸素を乖離しやすく毛細血管に到る前の細動脈で酸素を話す可能性が示唆される。その逆に高酸素親和性の場合、酸素は細動脈では乖離せずその下流に到着し初めて酸素を放すとも期待される。酸素を必要とする組織は毛細血管部位であり、高酸素親和性の Hb 製剤を用いた、より深部組織（細動脈から毛細血管側）に酸素を送り込むことが可能とも期待される。その一方で、ほ乳類の Hb はいずれも酸素親和性は比較的低い。生命の進化の中で選ばれた値の重みを考えるに、高酸素親和性の Hb 製剤の意義は不確かであろう。この点は今後の実験事実で積み上げることが必要であり、本製剤を用いて、酸素親和性の値の比較などの基礎研究が期待される。

E. 結論

酸素親和性の高い SNO-PEG-Hb の製造を実施し、通常の酸素親和性の SNO-PEG-Hb とともに供給を開始した。製造工程や物性など特に大きな問題はなく、動物実験に基づ

く結果の考察が待たれる。

F. 研究発表

1. Kunihiko Nakai, Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Satoh, Akira Kitabatake: S-nitrosylated polyethylene glycol-conjugated hemoglobin derivative as a candidate material for oxygen therapeutics. In: Polymer drugs in the clinical stage: Advantages and prospects. Maeda H, ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003 in press
2. Yutaka Makino, Michiaki Imamura, Mitsuhiro Isaka, Shoji Fukushima, Ichiro Sakuma, Kunihiko Nakai, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake, Yoshikazu Takeuchi, Osamu Kenmotsu, Keishu Yasuda: Artificial blood usage for non-transfusion cardiopulmonary bypass. Artificial Organs 2003 in press
3. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、佐久間一郎、仲井 邦彦、佐藤 洋、北畠 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: 31-34, 2002
4. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、仲井 邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、北畠 顕、劔物 修 ヘモグロビン系人工酸素運搬体：体外循環、人工血管コーティング、心筋保護等臨床応用にむけての基礎的検討 Cardiovascular Anesthesia 6: 67-71, 2002

5. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、仲井 邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、劔物 修、北畠 顕へ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: 17-20, 2002
 6. Mitsuhiro Isaka, Ichiro Sakuma, Michiaki Imamura, Yutaka Makino, Shoji Fukushima, Kunihiro Nakai, Norihiko Shiiya, Osamu Kenmotsu, Akira Kitabatake and Keishu Yasuda MD: The effects of a novel perfluorooctyle bromide emulsion administered during cardiopulmonary bypass: inflammatory reaction. Artificial Organs 2003, in press
2. 学会発表
1. Subrina Jesmin, Hiroko Togashi, Hiroshi Otani, Kunihiro Nakai, Ichiro Sakuma, Mitsuhiro Yoshioka, Akira Kitabatake: An s-Nitrosylated Hemoglobin Derivative Protects Rat Brain From Cerebral Ischemia. 第 67 回日本循環器学会学術集会、福岡、2003. 3. 29. Circulation J 67(Suppl I): 221, 2003
 2. Isaka M, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Sakuma I, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K: Inflammatory Reactions Induced by an Application of Perfluorooctylbromide Protective Effects of a Novel Perfluorocarbon Emulsion Administered during Cardiopulmonary Bypass. Tokyo, 2003. 3. 4. Artificial Blood 11(1): 86, 2003
 3. Isaka M, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Sakuma I, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K: Inflammatory Reactions Induced by an Application of Perfluorooctylbromide Emulsion during Cardiopulmonary Bypass with Moderate Hemodilution. The 9th International Symposium on Blood Substitutes. Tokyo, 2003. 3. 4. Artificial Blood 11(1): 110, 2003
 4. Fukushima S, Kubota H, Kishimoto S, Sakuma I, Nakai K, Fujii S, Kitabatake A, Takeuchi Y: Effect of Pegylation on Stability, Toxicity, and Pharmacokinetics of Perfluorocarbon Emulsion as Blood Substitutes. The 9th International Symposium on Blood Substitutes. Tokyo, 2003. 3. 4. Artificial Blood 11(1): 122, 2003
 5. T Sugawara, K Nakai, H Togashi, I Sakuma, S Fujii, M Yoshioka, H Satoh A Kitabatake: S-nitroso-PEG-Hemoglobin as a Candidate for oxygen transporting material. The 13th World Congress of the International Society for Artificial Organs, Osaka, Japan 2002. 11. 6.
 6. K Nakai, H Togashi, T Sugawara, I Sakuma, M Yoshioka, H Satoh, A Kitabatake: Safety evaluation of S-nitrosylated pegylated hemoglobin as a candidate oxygen carrier. The 13th World Congress of the International Society for Artificial Organs, Osaka, Japan 2002. 11. 6.
 7. Satoshi Fujii, Ichiro Sakuma, Keiko

- Watano, Daisuke Goto, Tomoo Furumoto, Takeaki Kaneko, Taeko Sugawara, Jie Dong, Naoki Ishimori, Yukihito Nakai, Tetsuya Mishima, Zaman Tarikuz, Akira Kitabatake, Kunihiro Nakai: Novel Polyethylene Glycol Conjugated S-Nitrosylated Hemoglobin Potently Inhibits Platelet Activation and Adhesion to Artificial Surfaces: Therapeutic Implications for Platelet-Rich Thrombus. 第66回日本循環器学会学術集会、札幌、2002. 4. 25. . Circulation J 66(Suppl I): 198, 2002
8. 井坂光宏, 今村道明, 椎谷紀彦, 牧野 裕, 福島昭二, 佐久間一郎, 仲井邦彦, 佐藤洋, 北島 顕, 安田慶秀: 体外循環における人工血液添加の有効性. 第40回日本人工臓器学会大会、札幌、2002. 10. 4.
 9. 菅原 武, 富樫広子, 井坂光宏, 仲井邦彦, 藤井 聡, 佐久間一郎, 吉岡充弘, 安田慶秀, 佐藤 洋, 北島 顕: SNO-PEG-ヘモグロビン修飾体の生体適合性—肝臓と腎臓への影響—. 第40回日本人工臓器学会大会、札幌、2002. 10. 4.
 10. 佐久間一郎, 仲井邦彦, 福島昭二, 富樫廣子, 菅原 武, 藤井 聡, 並河和彦, 小田切優樹, 藤堂 省, 劔持 修, 吉岡充弘, 北島 顕: 臨床応用を目的とした人工赤血球の開発. 第9回日本血液代替物学会年次大会、熊本、2002. 9. 4.
 11. 浅沼博司, 野出孝一, 真田昌爾, 高島成二, 佐久間一郎, 北島 顕, 仲井邦彦, 堀 正二, 北風政史: 人工酸素運搬体 SNO-PEG-Hb の虚血心筋保護作用—NO 供与体としての役割. 第2回日本NO学会学術集会、東京、2002. 5. 24.
 12. 北島 顕、佐久間一郎、藤井 聡、吉岡充弘、富樫廣子、仲井邦彦、藤堂 省、劔物 修、安田慶秀、福島昭二、小田切優樹、並河和彦: 臨床応用をめざした人工赤血球の開発. 第2回産学連携フォーラム—医学2002、東京、2002. 12. 18.
- G. 知的所有権の出願・登録状況
- 米国特許(米国出願 09/499758)および欧州特許(00102156.7)について申請中であり、最終審査段階となった。関係当局と協議中である。

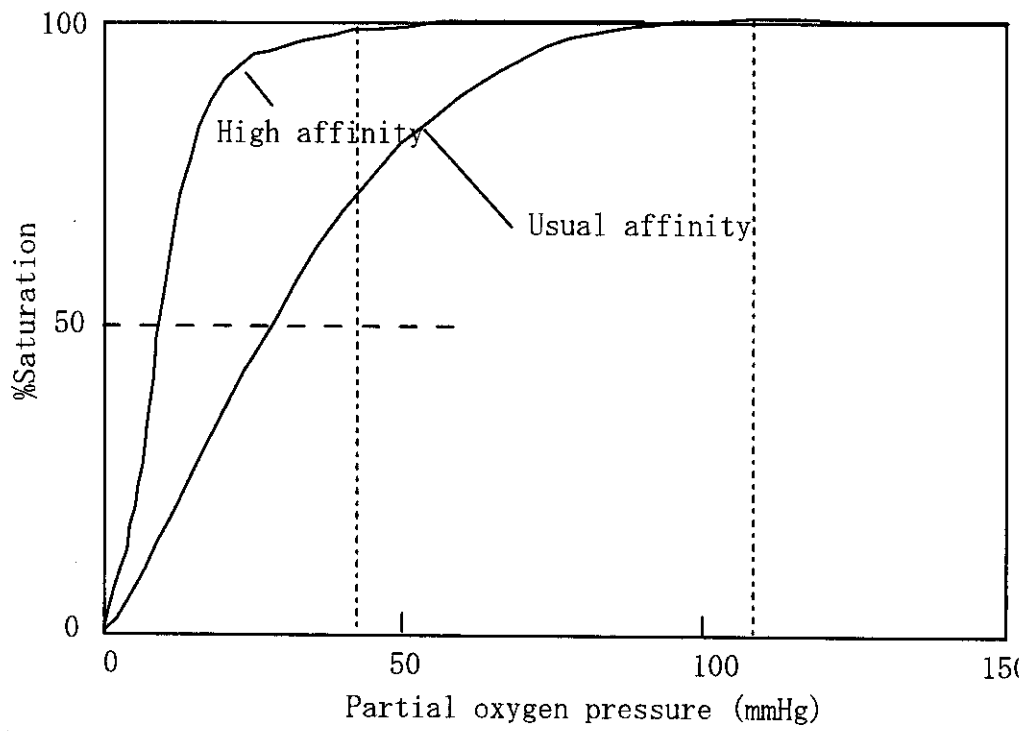


Fig. 1. 酸素親和性の解析例

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 藤堂 省 北海道大学大学院医学研究科教授

研究要旨 脳死肝移植では、donor 肝輸送時の肝細胞保護および再灌流時の肝細胞障害が問題となる。肝臓は4℃に保たれた状態でも多少酸素消費が行われているものと考えられ、その間に人工酸素運搬体により酸素を供給することは、donor 肝輸送時の肝細胞保護に結びつく可能性がある。パーフルオロケミカル（PFC）製剤はヘモグロビン修飾型の人工血液と異なり、4℃においても理論上酸素供給が可能であることから、保護液に添加することにより肝細胞保護作用を発揮することが期待される。本年度は乳化剤としてHCO-60を用い、PFCとしてFC43を使用したPFCエマルジョンで、平均粒子径を210nmとやや大きくした製剤を作製した。実際の肝移植時をシミュレートした冷保存条件下（4℃）において、5%PFCエマルジョンを混合したUW液が、24時間灌流停止放置状態の摘出肝に酸素を供給することより、灌流停止および阻血再灌流による障害から肝細胞を保護するか否かを検索した。結果として、肝冷保存液中にPFCエマルジョンを加えることにより、24時間後の再灌流で、門脈流量、胆汁産生量、酸素消費量の増加、乳酸の低下などの改善傾向を認めた。しかし、逸脱酵素の低下は認めなかった。PFCエマルジョンが肝冷保存再灌流障害を軽減する可能性が示唆されたが、確証は得られなかった。HCO-60とFC43の混合によるPFCエマルジョンは比較的安定であることから、今後FC43濃度の増加もしくは冷保存液中の濃度を増加させてさらに検討を重ねる必要があると考えられた。

ラット単離肝灌流モデルを用いたパーフルオロケミカル製剤（FC-43・HCO-60）による肝冷保存再灌流障害を軽減作用の検討

A. 研究目的

脳死臓器移植がわが国でもルーチンに行われるようになったが、脳死肝移植実施上の問題点のひとつに donor 肝輸送時の肝細胞保護および再灌流時の肝細胞障害がある。Donor

肝は4℃に冷却された保護液にて輸送され、その最大window periodは24時間とされている。これは donor 心臓の window period の4時間と比して余裕があるものの、保存中はできるだけ肝細胞が保護されることが望ましい。肝臓は4℃冷保存中でも多少酸素消費が行われていると考えられ、その間に多少なりとも酸素を供給することは、donor 肝輸送時の肝細胞保護および再灌流時の肝細胞障害回避に結び

つく可能性がある。パーフルオロケミカル (PFC) 製剤はヘモグロビン修飾型の人工血液と異なり、4℃においても理論上酸素供給が可能であることから、保護液に添加することにより肝細胞保護作用を発揮することが期待される。実際、膵移植においては、PFC と保存液を2層にした境界面に膵臓を置いて保存することにより、膵細胞移植成績の向上が報告されている。しかるに、肝臓は実質臓器であることから、PFC をエマルジョンに溶解した PFC エマルジョンとし、それを保護液中に添加する方法が実用的と考えられる。

本研究班では PFC エマルジョンの保存液への添加が肝移植時の donor 肝細胞保護に応用可能か否かを検討してきた。一昨年度はラット単離肝虚血再灌流モデルを用い、非低温条件下で実験を行い、ある程度の成果が得られたが、その際栓塞形成が問題となった。昨年度は、新規 PFC 製剤を再設計し、実際の肝移植時をシミュレートした低温下条件において、PFC 製剤を5%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より、灌流停止および虚血再灌流に基づく種々のストレスによる障害から肝細胞を保護するか否かを検索したが、有意な効果は認められなかった。本年度は、PFC エマルジョン製剤として、昨年と同じ FC43 と HCO-60 を使用したが、粒子径をやや大きくしたものを作製し、昨年度と同様な検討を行った。

B. 研究方法

飲水と食餌を自由に与えた雄性 Lewis ラット (体重 150~200 g) を実験に供した。ペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内投与後、ヘパリン 1000IU を陰茎背静脈より投与した。腹部横切開により腹膜内に到達し、総胆管にポリエチレンチューブ (Clay Adams, PE10) を挿入し、次いで、門脈に 14G ETFE チューブ (Terumo, SURFRO) を挿入した。その後直ちに灌流回路と ETFE チューブを連結し、氷冷 UW

液もしくは5% PFC 製剤添加 UW 液で門脈から肝臓を 30 ml の氷冷 UW 液にて、初期圧 10 cmH₂O にて灌流した。30 ml の灌流終了後、カニューレが付いた状態で肝臓を単離し、重量測定を行った後に虚血ユニットに移した。虚血ユニットは恒温槽とプラスチック製の外とうで囲まれている。次いで、UW 液もしくは5% PFC 製剤添加 UW 液 30 ml で満たした状態で、4℃にて24時間静置された。その後、30 ml の氷冷 Lactate Ringer 液を用い初期圧 20 cmH₂O にて wash out し、再灌流装置に接続した。再灌流装置はコンピューターで制御されたローラーポンプ (Model Miniplus 3, Glison Electronics, Villers le Bel, France)、恒温ユニット、ハミルトン酸素化装置、門脈圧測定用圧測定装置とリザーバーからなり、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には常に 95% O₂、5% CO₂ ガスが吹き込まれた。単離肝臓の再灌流は 37℃条件下で、2% BSA を添加した Krebs-Henseleit 液にヒアルロン酸 1000 μg/L と胆汁酸 30 μM/hr を加え、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。単離肝臓はリザーバーの上に静置し、120 分間再灌流された。

PFC 製剤は本研究班研究協力者の神戸学院大学薬学部薬効学福島昭二助教授より供給されたもので、PFC (FC-43) 820 g に界面活性剤 (乳化剤) として HCO-60 を 33 g を加え、注射用水 1200 を添加して PFC 50% (w/v) とした製剤である。調製法としては、窒素置換した注射用水に HCO-60 を分散し、窒素気流下、高圧ジェット流型乳化機を用い、デュアルフィード法 15,000 psi の運転圧力で FC43 を乳化した。その後、30,000 psi の運転圧力にて本乳化し、平均粒子径 210 nm のエマルジョン製剤とした。本エマルジョンは、冷所あるいは室温保存において、数ヶ月間は安定であった。

使用前に UW 液に 10 % (1 : 9) で混合し、PFC 濃度としては 5 % に調整したのち使用した。

本研究では再灌流までの処置を以下の 2 群に分けて行った (n=3, 3)。PFC 非添加群 : UW 液のみで PFC を添加しなかった群、PFC 添加群 : PFC を UW 液に 5 % 添加して肝臓を灌流した群。なお、PFC を 5 % 添加した状態では、溶液中の酸素溶解量は非添加時の約 2 倍となると計算される。

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、AST、ALT 放出量 : 再灌流 30、60、90、120 分後の灌流液中の LDH、AST、ALT 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。5) 乳酸排出量 : 再灌流 30、60、90、120 分後の肝臓からの乳酸排出量を計測した。

倫理面の配慮

実験にあたっては、前もって北海道大学医学部動物研究委員会に実験計画書を提出し、裁可を得た。

C. 研究結果

ラット単離肝灌流モデルにおいて、肝冷保存液中に PFC エマルジョンを 5 % 加えることにより、24 時間後の再灌流で、門脈流量、胆汁産生量、酸素消費量の増加、乳酸の低下などの改善傾向を認めた (図 1 ~ 4)。

しかし、逸脱酵素の低下は認めなかった (図 5)。

PFC エマルジョンが肝冷保存再灌流障害を軽減する可能性が示唆されたが、現在の製剤および濃度では確証は得られなかった。

D. 考察

本研究の結果より、低温下において本研究で用いた 50 % PFC 製剤を 10 % 添加して 5 % 濃度とし、それを非酸素化条件で UW 液に 24 時間静置した状態では、再灌流後に門脈流量、胆汁産生量、酸素消費量の増加、乳酸の低下などの改善傾向を認めたものの、逸脱酵素の低下は認められず、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、肝細胞を明確に保護するとの結論は得られなかった。本モデルは冷粗血モデルであるが、これは実際の脳死肝移植において肝臓を 4℃ で保存することから、臨床をシミュレートした実験と考えられる。通常の臨床では単離後 12 時間以内に移植を行うが、本実験では 24 時間静置しており、障害がある程度起こるので保護剤の有効性を検索するのに適した方法である。

本実験で、PFC エマルジョン製剤の有効性が確認されなかった原因としては、まず添加濃度が 5 % と低く、十分に酸素溶解量を上昇出来なかった点が挙げられる。本年度の検討では、昨年度と異なり、粒子径のやや大きな安定した製剤を使用した。やはり明確な効果は認められなかった。一方、本年度に昨年度の本研究を基に開始されたモルモット心臓を用いた冷保存再灌流実験では、顕著な保護効果が確認されている (本研究班動物報告書)。この相違は、まず PFC エマルジョンが肝臓では類洞内皮細胞や、クッパー細胞などの網内系細胞に捉えられ、内皮細胞障害さらに肝細胞障害をむしろ惹起するように作用した可能性がある。また、本研究では UW 液を酸素化しておらず、一方心臓保存時は、一時的に酸素化した UW 液と 5 % PFC エマルジョンを使用した。保護実験では 24 時間の保存を行うため、酸素化は実用的ではないので、本研究では施行しなかったが、PFC エマルジョンの酸素供給能は酸素分圧に比例して高くなることから、今後は PFC エマルジョンをより細胞障害性のすくないものとする。さらに PFC のエマルジョンへの溶解濃度を高めるとともに、その際に一時的であれ PFC エマル

ジョンに酸素化を行うことが、肝保護作用を発揮させる方策と考えられる。

E. 結論

PFC エマルジョン製剤が肝移植時の donor 肝保護に応用可能か否かを検討するため、ラット単離肝阻血再灌流モデルを用い、低温下で新規 PFC エマルジョンを 5% 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より、灌流停止時の肝細胞保護および再灌流による肝細胞障害を軽減可能か否かを検索した。その結果、4 °C 条件下において 24 時間保存後 37 °C 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、より細胞障害性の低い PFC エマルジョンを創製すること、添加 PFC エマルジョン濃度を上昇させること、酸素化を加えることなどを行い、再検討する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima Y, Shimamura T, Kamiyama T, Matsushita M, Sato N, Todo S: Control of Intraoperative Bleeding During Liver Resection: Analysis of a Questionnaire Sent to 231 Japanese Hospitals, *Surgery Today* 32: 48-52, 2002
2. 嶋村剛、陳孟鳳、鈴木友己、谷口雅彦、蒲池浩文、萩原邦子、神山俊哉、松下通明、古川博之、藤堂省: 特集わが国における肝移植の現況と展望. 適応拡大への問題点と対策. 劇症肝炎症例への移植. *消化器外科* 25(3): 297-304, 2002
3. 神山俊哉、古川博之、藤堂省: 肝臓手術. 肝移植ドナー手術. *消化器外科周術期管理のすべて* 263-269, 2002
4. 嶋村剛、古川博之、藤堂省: 肝臓手術. 肝移植レシピエント手術. *消化器外科周術期管理のすべて* 270-278, 2002
5. 藤堂省、古川博之、嶋村剛、陳孟鳳、鈴木友己: 肝移植治療法の進歩. *日本内科学会雑誌* 91(Suppl): 43-50, 2002
6. 嶋村剛、陳孟鳳、鈴木友己、谷口雅彦、蒲池浩文、萩原邦子、神山俊哉、松下通明、古川博之、藤堂省: 適応拡大への問題点と対策. 劇症肝炎症例への移植. *消化器外科* 25(3): 297-304, 2002
7. Ishikawa H, Jin MB, Ogata T, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Magata S, Horiuchi H, Ogata K, Masuko H, Fujita M, Furukawa H, Todo S: Role of cyclic nucleotides in ischemia and reperfusion injury of canine livers. *Transplantation* 73(7): 1041-1048, 2002
8. Kamachi H, Matsushita M, Okubo H, Kawai T, Nishikawa K, Fujimoto T, Todo S: Rat small hepatocytes for liver support: growth and metabolic activities in culture. *J Artif Organs* 5: 24-29, 2002
9. 藤堂省、古川博之、松下通明、嶋村剛、陳孟鳳、鈴木友己、谷口雅彦: 特集生体肝移植の現況と展開. 3. 適応 2) B 型肝硬変・C 型肝硬変・肝癌に対する肝移植. *日本外科学会雑誌* 103(5): 408-413, 2002
10. Noto H, Matsushita M, Nishikawa M, Okubo H, Kamachi H, Nishikawa K, Fujimoto T, Todo S: Injuriousness of glycochenodeoxycholate and taurochenodeoxycholate to cultured hepatocytes. *J Artif Organs* 5: 30-36, 2002
11. Nomura M, Yamashita K, Murakami M, Takehara M, Echizenya H, Sunahara M, Kitagawa N, Fujita M, Furukawa H, Uede T, Todo S: Induction of donor-specific tolerance by adenovirus mediated CD40lg gene therapy in rat liver transplantation. *Transplantation* 73(9): 1403-1410, 2002
12. Okubo H, Matsushita M, Kamachi H, Kawai T, Takahashi M, Fujimoto T, Nishikawa K,

- Todo S: A Novel Method for Faster Formation of Rat Liver Cell Spheroids. *Artificial Organs* 26(6): 497-505, 2002
13. 嶋村剛、陳孟鳳、鈴木友己、谷口雅彦、古川博之、藤堂省: 肝移植. year note 2003 別冊 Selected Articles 239-250, 2002
 14. 古川博之、藤堂省: 異種臓器移植-Pro: 異種移植は臓器不全を救えるか?-. 血液・免疫・腫瘍 7(3): 86-90, 2002
 15. 嶋村剛、陳孟鳳、鈴木友己、谷口雅彦、古川博之、藤堂省: 当科における脳死肝移植の経験. 今日移植 15(4): 346-353, 2002
 16. 藤堂省: 特集 1. 本庄一夫記念・肝臓シンポジウム 2. 肝細胞癌と肝移植. 外科 64(11): 1242-1256, 2002
2. 学会発表
1. 藤堂省: 特別企画 6. 本庄一夫記念・肝臓シンポジウム「肝細胞癌と肝移植」、第 102 回日本外科学会定期学術集会、京都市、2002. 4. 13
 2. 藤堂省: 「肝臓癌の肝移植」、第 5 回肝癌再発予防研究会、豊中市、2002. 5. 10
 3. Todo S: Technical aspects of LDLTx, LDLTx for HCC, Loyola University School of Medicine, Chicago, USA, 2002. 6. 11
 4. Todo S: Use of Marginal/Expanded Donor in Liver Transplantation. Satellite Symposium to the International Liver Transplantation Society Eighth Congress, Chicago, USA, 2002. 6. 13
 5. Todo S: Technical pitfalls in adult LRD and Asian Registry. Adult to Adult Living Unrelated/Related Liver Transplantation, State-of-the-Art Symposia, XIX International Congress of the Transplantation Society, Fort Lauderdale, USA, 2002. 8. 27
 6. 藤堂省: わが国の移植医療を考える、第 40 回日本人工臓器学会大会、札幌市、2002. 10. 3
 7. Todo S: Living-related Liver Transplantation. The 3rd Turkish National Transplantation Congress, Adana, Turkey, 2002. 10. 18
 8. 藤堂省: 肝癌と肝移植、第 80 回日本消化器病学会九州支部例会・第 74 回日本消化器内視鏡学会九州支部例会、佐賀市、2002. 11. 29
 9. 佐々木彩実、工藤岳秋、蒲池浩文、嶋村 剛、陳 孟鳳、古川博之、藤堂 省: 「教室で経験しえた脳死肝移植症例 2 例の検討」第 76 回北海道外科学会、2002. 02. 02. 札幌
 10. 藤堂 省: 「肝細胞癌と肝移植」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号: 55, 2002
 11. 古川博之、嶋村 剛、陳 孟鳳、神山俊哉、松下通明、藤堂 省: 「肝癌と生体肝移植」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号: 116, 2002
 12. 中山雅人、陳 孟鳳、櫻井経徳、藤田美俐 1、武田圭佐、嶋村 剛、松下通明、古川博之、藤堂 省 (1 北大第二病理): 「肝虚血再灌流障害に対する PDEⅢ阻害剤オルプリノンの効果」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号 376, 2002
 13. 武田圭佐、陳 孟鳳、藤田美俐 1、深井 原、櫻井経徳、嶋村 剛、松下通明、古川博之、藤堂 省 (1 北大第二病理): 「ROCK 阻害剤 (Y-27632) のラット肝虚血再灌流障害に対する効果」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号 378, 2002
 14. 橋本 卓、山下健一郎、小林篤寿、崎浜秀康、華 南、増永太郎 1、嶋村 剛、陳 孟鳳、古川博之、藤堂 省 (1 北大遺伝子病研究所分子免疫部門): 「ラット肝移植、心移植における遺伝子治療の免疫抑制効果」

- 第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号 395, 2002
15. 華南、山下健一郎、橋本卓、増永太郎 1、小林篤寿、陳孟鳳、嶋村剛、古川博之、藤堂省 (1 北大遺伝子病研究所分子免疫部門): 「Concordant 異種心移植における FK779 と遺伝子治療の併用による免疫抑制効果」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号 396, 2002
 16. 小林篤寿、山下健一郎、越前谷勇人、橋本卓、華南、増永太郎 1、陳孟鳳、嶋村剛、古川博之、藤堂省 (1 北大遺伝子病研究所分子免疫): 「ラット心移植における新規ピリミジン系代謝拮抗剤、FK778 および FK779 の免疫抑制効果」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号 529, 2002
 17. 深井原、陳孟鳳、嶋村剛、河合朋昭、古川博之、松下通明、藤堂省: 「肝温虚血再灌流障害における虚血中の酸化障害の役割」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号 530, 2002
 18. 長佐古良英、陳孟鳳、砂原正男、高田尚幸、昆泰寛 1、嶋村剛、古川博之、藤堂省 (北大獣): 「肝腎症候群に対する生体肝移植: 肝局所レニン・アンギオテンシン系からの解析」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号 603, 2002
 19. 松下通明、菊地弘展、長佐古良英、中山雅人、太田稔、嶋村剛、陳孟鳳、神山俊哉、古川博之、藤堂省: 「術後合併症からみた生体肝移植ドナー 55 例の検討」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号 603, 2002
 20. 鈴木友己、陳孟鳳、嶋村剛、谷口雅彦、中山雅人、緒方俊郎、長佐古良英、神山俊哉、松下通明、古川博之、藤堂省: 「small-for-size graft 生体肝移植における肝循環と類洞内皮障害」第 102 回日本外科学会定期学術集会、2002. 04. 11-13. 京都、日本外科学会雑誌 103 臨時増刊号 605, 2002
 21. 古川博之、嶋村剛、陳孟鳳、鈴木友己、谷口雅彦、横山良二、蔵谷大輔、船越徹、萩原邦子、太田稔、神山俊哉、松下通明、藤堂省: 「北大における脳死肝移植の 3 例」第 6 回北海道移植フォーラム、2002. 06. 02. 札幌
 22. 古川博之、嶋村剛、陳孟鳳、鈴木友己、谷口雅彦、神山俊哉、松下通明、藤堂省: 「肝癌に対する生体肝移植」第 38 会日本移植学会総会、2002. 10. 17-19. 東京、移植 37 巻 総会臨時号 157
 23. 陳孟鳳、嶋村剛、古川博之、鈴木友己、谷口雅彦、中山雅人、橋本卓、萩原邦子 1、神山俊哉、松下通明、藤堂省 (1 北大病院臓器移植医療部): 「成人生体肝移植におけるグラフト重量と肝血流の関係」第 38 会日本移植学会総会、2002. 10. 17-19. 東京、移植 37 巻 総会臨時号 177
- G. 知的所有権の出願・登録状況 なし

图 1. Weight ratio of the liver after reperfusion

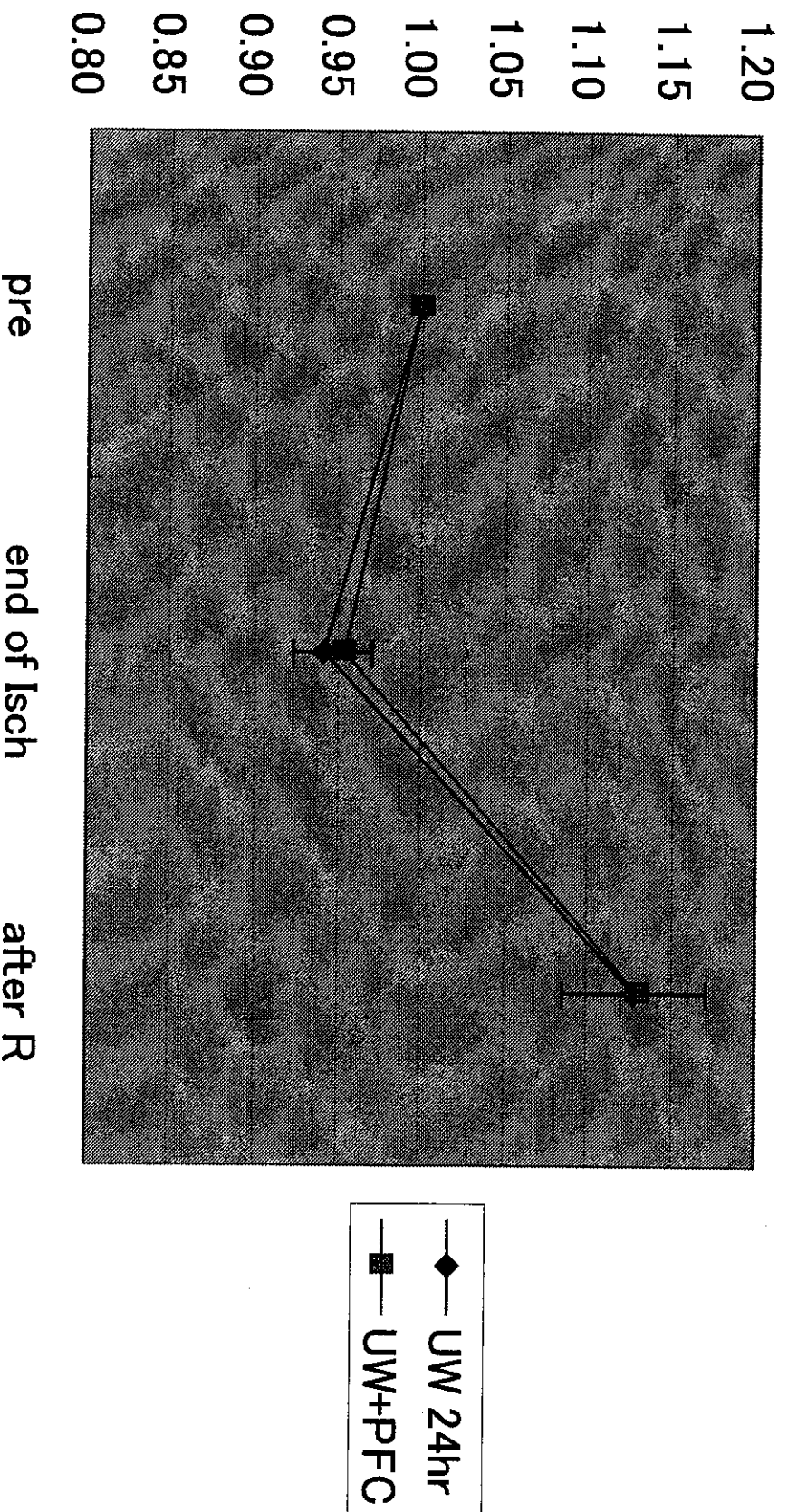
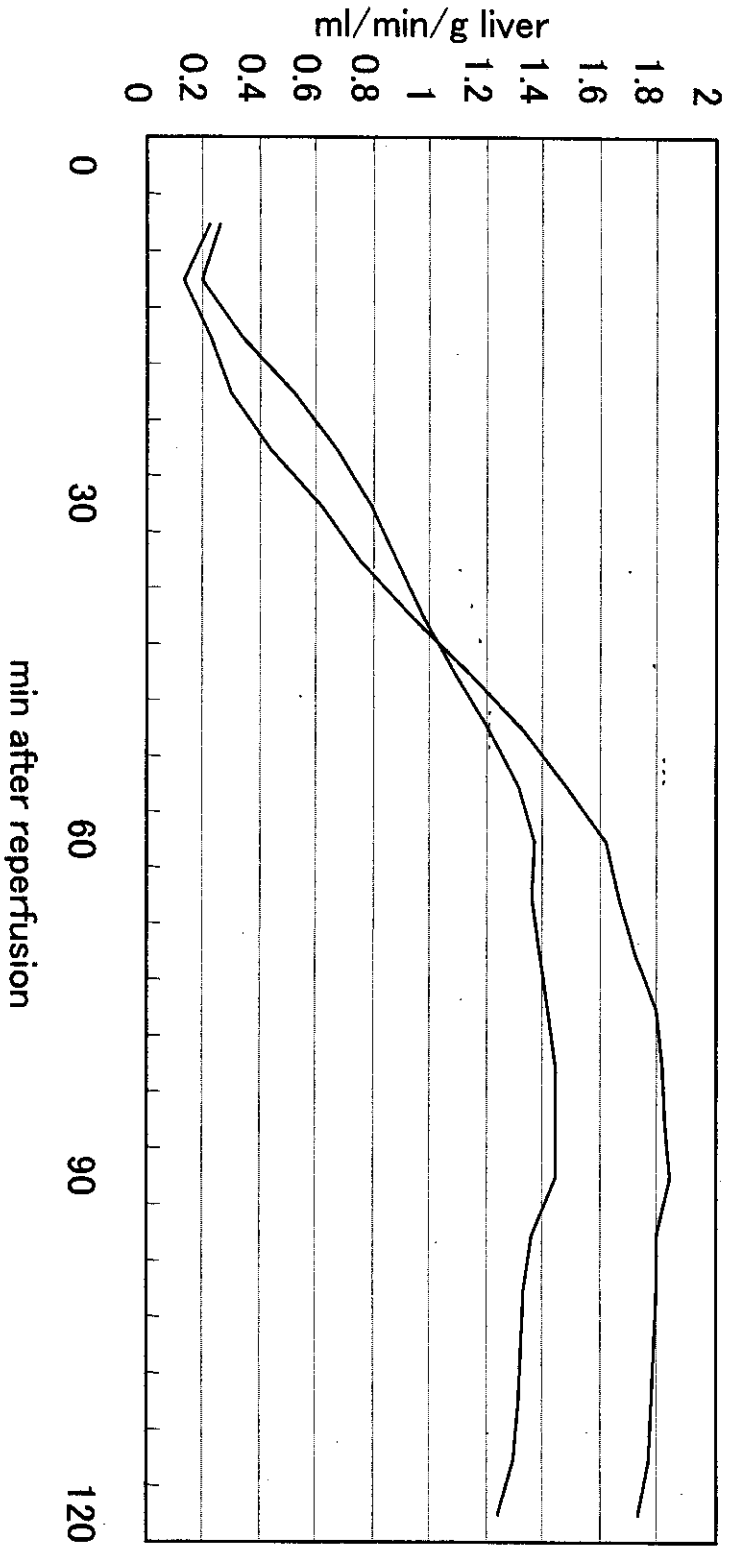


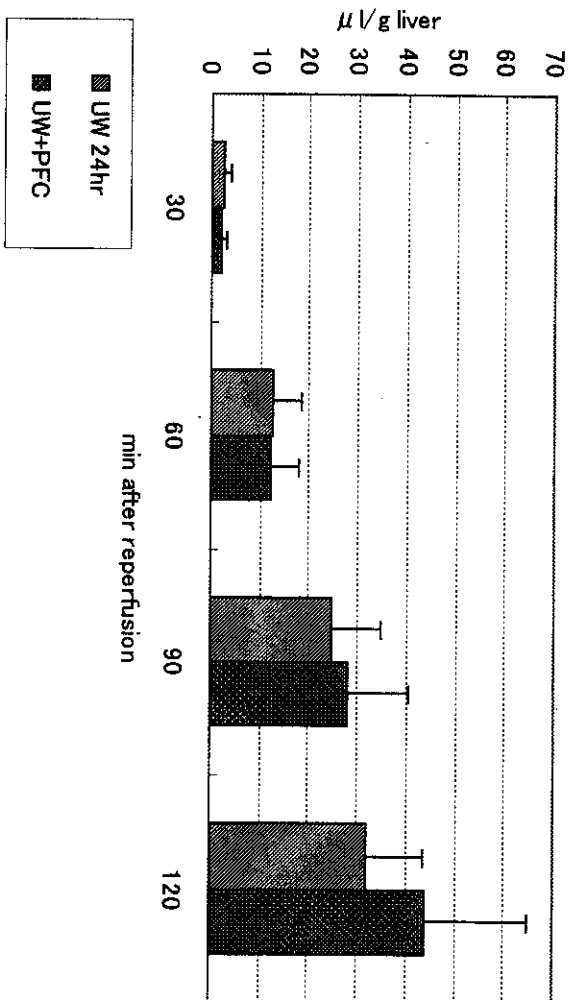
Figure 2. PV flow of IPRL



— UW 24hr
- - UW+PFC

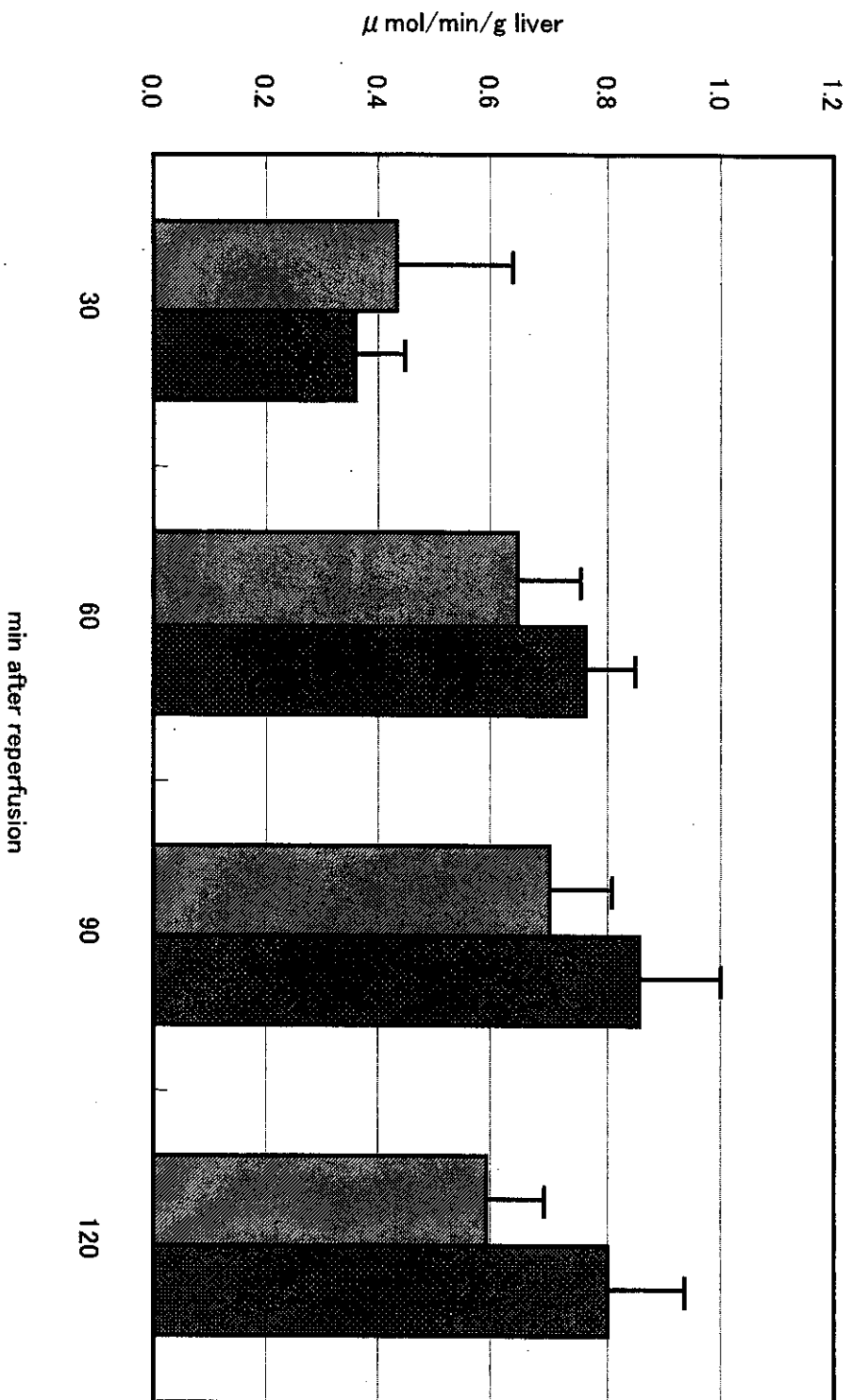
図3. Bile production

Bile production



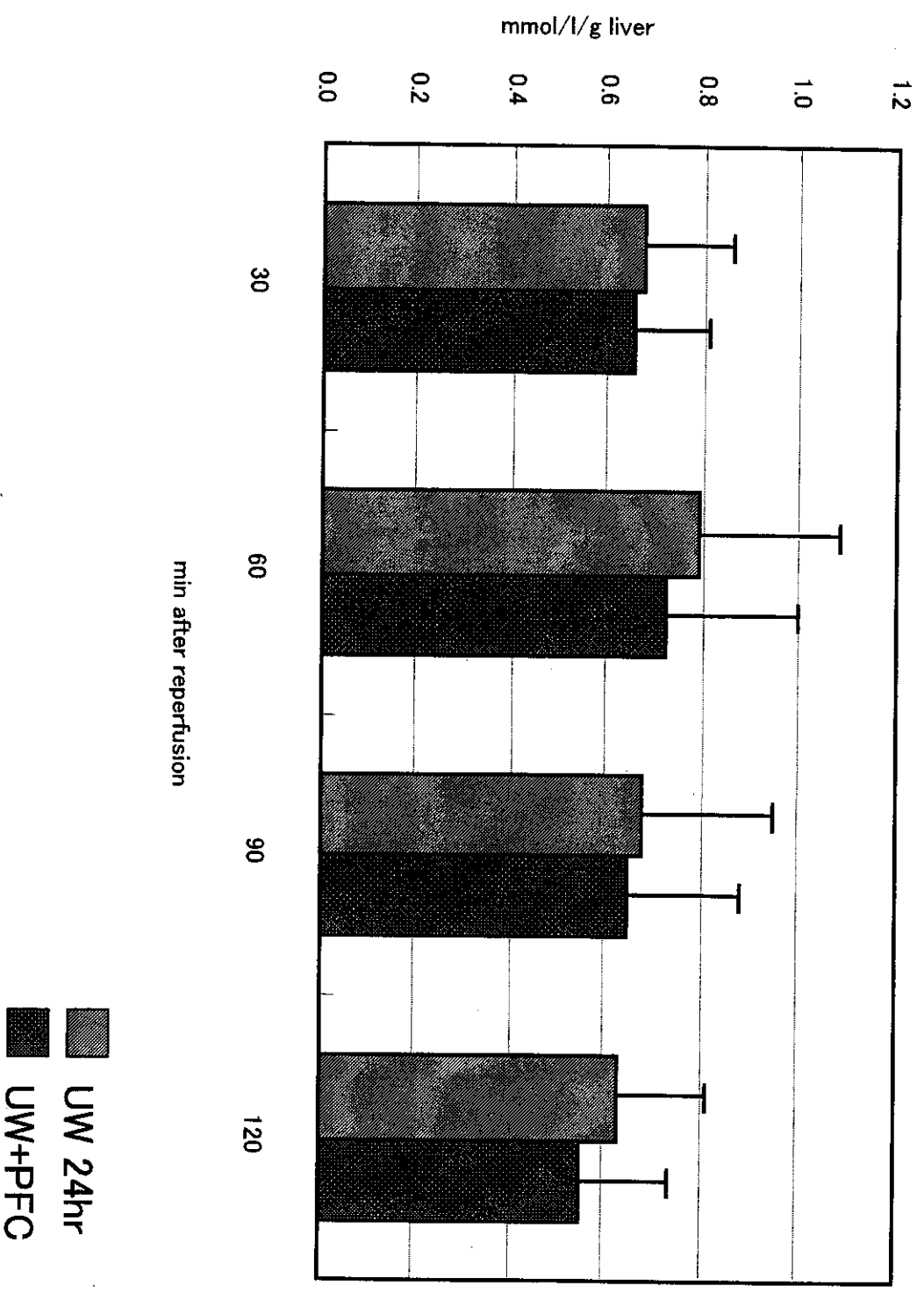
UW 24hr
UW+PFC

图4. O₂ consumption



UW 24hr
UW+PFC

Figure 5. Lactate of the perfusate



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 パーフルオロケミカル（PFC）製剤はヘモグロビン修飾型の人工血液と異なり、4℃においても理論上酸素供給が可能であることから、保護液に添加することにより移植心保護作用を発揮することが期待される。本研究班では PFC エマルジョンの保存液への添加が心移植時の donor 心保護に応用可能か否かを検討した。PFC として FC-43、界面活性剤（乳化剤）として HCO-60 を用いた新規 PFC エマルジョンを 4℃の ST Thomas 液に添加し、酸素化を行った ST Thomas 液を単離モルモット心の冷却保護液として使用した場合、非酸素化 ST Thomas 液もしくは酸素化 ST Thomas 液を使用した場合と比べて心筋が保護され、加温再灌流後に心筋酸素消費量の維持、Developed Pressure の保持がもたらされることが示された。また、CK や LDH などの逸脱酵素も、PFC エマルジョン製剤添加酸素化 ST Thomas 液で、酸素化もしくは非酸素化 ST Thomas 液のみを使用した場合と比較しわずかであった。また、PFC エマルジョン製剤添加酸素化 ST Thomas 液では、ノルエピネフリン放出量他群に比して有意に少量であった。したがって、新規 PFC エマルジョンの添加により、現在より心移植時の移植心保存の window period の延長がもたらされる可能性が示された。今後、さらに大型の心臓を用いた検討が望まれると考えられた。

単離心保護に対する新規パーフルオロケミカルエマルジョンの効果

A. 研究目的

脳死心移植がわが国でも行われるようになったが、脳死心移植実施上の問題点のひとつに donor 心輸送時の window period が短いことがある。Donor 心は 4℃に冷却された保護液にて輸送され、その最大 window period は 4 時間とされている。従って、わ

が国においては、doner 心が得られても recipient の住居地が時間的に遠い場合は、心移植施行が困難となる。従って、window period が延長することは、わが国において脳死心移植の選択範囲を広めることにつながるといえる。

パーフルオロケミカル（PFC）製剤はヘモグロビン修飾型の人工血液と異なり、4℃においても理論上酸素供給が可能であることから、保護液に添加することにより移植心

保護作用を発揮することが期待される。実際、膵移植においては、PFC と保存液を2層にした境界面に膵臓を置いて保存することにより、膵細胞移植成績の向上が報告されている。しかるに、心臓は実質臓器であることから、PFC をエマルジョンに溶解した PFC エマルジョンとし、それを保護液中に添加する方法が実用的と考えられる。

本研究班では PFC エマルジョンの保存液への添加が心移植時の donor 心保護に応用可能か否かを検討した。

B. 研究方法

1. 使用動物

体重 300-400g の Hartley 系雄モルモットを使用。

実験群としては、非酸素化心臓保護液 (St-Thomas 液) 群、酸素化心臓保護液群 (St-Thomas 液)、酸素化人工血液群 (10% PFC、5%BSA 含有 St-Thomas 液) とした。なお人工血液群では、St-Thomas 群の電解質組成と一致するように電解質補正を行った。

2. 使用心臓保護液および人工血液製剤

St Thomas 第二液 (Na^+ 120.0mEq/L, K^+ 16.0 mEq/L, Mg^{2+} 32.0 mEq/L, Ca^{2+} 2.4 mEq/L, HCO_3^- 10.0 mEq/L, Cl^- 160.4 mEq/L) を心臓保護液として使用した。

使用 PFC エマルジョン製剤は本研究班研究協力者の神戸学院大学薬学部薬効学福島昭二助教授より供給されたもので、PFC (FC-43) 820 g に界面活性剤 (乳化剤) として HCO-60 を 33 g を加え、注射用水 1200 を添加して PFC 50% (w/v) としたものである。調製法としては、窒素置換した注射用水に HCO-60 を分散し、窒素気流下、高压ジェット流型乳化機を用い、デュアルフィー

ド法 15,000 psi の運転圧力で FC43 を乳化した。その後、30,000 psi の運転圧力にて本乳化し、平均粒子径 210 nm のエマルジョン製剤とした。本エマルジョンは、冷所あるいは室温保存において、数ヶ月間は安定であった。

使用前に St-Thomas 液に 10% (1:9) で混合し、PFC 濃度としては 5% に調整したのち使用した。また人工血液群では、St-Thomas 第二液の電解質と同様になるよう電解質補正を実施した。

3. 実験プロトコール

前処置として、ヘパリン 1000U/250g およびケタミン 30mg/kg を腹腔内投与し、15 分後に心臓を摘出し、大動脈圧 30mmHg、左室拡張期圧 10mmHg、心温 37°C 下で心臓を Krebs-Henseleit 液 (KHS) でまず 30 分間灌流し、その後さらに 30 分間灌流 (baseline) した。その後、4°C の心臓保護液または PFC 含有 St-Thomas 液 (BSA 含有) により、10 分間で cooling (終了時の心臓表面温度: $12.1 \pm 0.7^\circ\text{C}$) し、酸素化 St-Thomas 液、非酸素化 St-Thomas 液、PFC 含有 St-Thomas 液 (BSA 含有) 下に 4°C 6 時間貯蔵した。貯蔵後、25°C St-Thomas 液により 10 分間で心臓表面温度が $25.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$ まで復温後、90 分間 KHS で灌流した。

4. 測定項目

血行動態の指標として心拍数、左室 Developed pressure、Coronary flow rate (ml/g/min) を継続的に測定した。

酸素代謝の指標として baseline、再灌流直後、再灌流 10 分、60 分時点で O_2 extraction ((arterial O_2 -venous O_2)/arterial $\text{O}_2 \times 100$) および心筋酸素消費量 ($\text{MVO}_2/0.1 \mu\text{l}/\text{min}$)、心効率 (Developed

pressure x 心拍数/心筋酸素消費量) を算出した。なお、arterial 値は心臓を通過する前の灌流液、venous 値は心臓を通過した後の灌流液の値とした。

また、 $\{1 - (\text{心乾重量}/\text{心湿重量})\} \times 100$ の計算式により心臓の浮腫率を計算した。逸脱酵素として、ノルエピネフリン、クレアチニンキナーゼおよび LDH (乳酸脱水素酵素) を測定した。

5. 統計処理

反復測定分散分析 (Bonferroni/Dunn 検定) により有意差検定を実施した。なお、心臓浮腫率は、多重比較検定 (Bonferroni/Dunn 検定) により、有意差検定を実施した。

倫理面への配慮

実験にあたっては、前もって北海道大学医学部動物研究委員会に実験計画書を提出し、裁可を得た。

C. 研究結果

1. 血行動態

心拍数および coronary flow rate (ml/g/min) に関して、3 群間には有意差を認めなかった。一方、Developed Pressure 値の反復測定分散分析では、 $p < 0.01$ となり、post-hoc 検定 (Bonferroni/Dunn 検定) にて、再灌流 60 分時点で、酸素化人工血液群は、非酸素化 St Thomas 群および酸素化 St Thomas 群と比較し、有意に高値を示した。なお、心拍再開までの時間および同調律リズムへの回復時間は、3 群間で有意差を認めなかった。

2. 酸素代謝

心効率 (%) には 3 群間で有意差を認めな

かったが、 O_2 extraction は反復測定分散分析により $p < 0.01$ を示し、baseline 時点で酸素化人工血液群と酸素化 St Thomas 群 (前者 < 後者)、再灌流直後の時点で酸素化人工血液群と非酸素化 St Thomas 群間に有意差 (前者 > 後者) を認めた。

また、心筋酸素消費量 ($MVO_2/0.1\mu\text{l}/\text{min}$) は反復測定分散分析で $p < 0.01$ を示し、再灌流直後と再灌流 60 分時点で酸素化人工血液群と非酸素化 St Thomas 群間に有意差を (前者 > 後者) 認めた。

3. ノルエピネフリン放出量

非酸素化 St. Thomas 群では、心臓貯蔵前の NE 量が 77.76 ± 29.15 pmol/g、再灌流時の NE 量が、 183.33 ± 30.16 pmol/g であった。酸素化 St Thomas 群では各々、 56.25 ± 6.74 および 172.29 ± 16.96 pmol/g、酸素化人工血液群各々、 89.80 ± 7.03 および 67.38 ± 11.91 pmol/g であり、心臓貯蔵前の NE 量には 3 群間に有意差も認めなかったが、再灌流時の NE 量は、ANOVA (Bonferroni/Dunn 検定) 検定により、酸素化人工血液群は、他の 2 群と比較し有意に低値を示した。

4. クレアチニンキナーゼ (CK)

反復測定分散分析で $p < 0.01$ を示し、baseline 時点では非酸素化 St Thomas 群が 9.86 ± 2.68 IU/L、酸素化 St Thomas 群が 9.75 ± 3.29 IU/L、酸素化人工血液群が 11.00 ± 3.83 IU/L と有意差を認めなかった。また、再灌流 60 分時点でも有意差を認めなかったものの、再灌流直後では酸素化人工血液群は他の 2 群に比して有意に低値を示し、再灌流 10 分時点では、非酸素化 St Thomas 群と比較し、酸素化人工血液群および酸素化 St Thomas 群が有意に低値となった。

5. LDH

反復測定分散分析では $p < 0.05$ を示し、baseline では、非酸素化 ST Thomas 群が 1.88 ± 0.44 IU/L、酸素化 ST Thomas 群が 3.75 ± 0.44 IU/L、酸素化人工血液群が 3.38 ± 0.50 IU/L をとなり、有意差を認めなかった。しかし、再灌流直後および再灌流 10 分時点では、酸素化人工血液群は非酸素化 ST Thomas 群と比較し有意に低値を示した。また、再灌流 60 分時点では、酸素化人工血液群は酸素化 ST Thomas 群と比較し有意に低値を示した。

6. 心臓浮腫率

非酸素化 ST Thomas 群 ($65.52 \pm 1.24\%$)、酸素化人工血液群 ($64.60 \pm 1.57\%$) および酸素化 ST Thomas 群 ($63.20 \pm 1.34\%$) であり、有意差を認めなかった。

D. 考察

本研究により、新規 PFC エマルジョン製剤を添加した酸素化 ST Thomas 液を、単離モルモット心の冷却保護液として使用した場合に、非酸素化 ST Thomas 液もしくは酸素化 ST Thomas 液を使用した場合と比較して心筋が保護され、加温再灌流後に心筋酸素消費量の維持、Developed Pressure の保持がもたらされることが示された。また、CK や LDH などの逸脱酵素も、PFC エマルジョン製剤添加酸素化 ST Thomas 液で、酸素化もしくは非酸素化 ST Thomas 液のみを使用した場合と比較してわずかであった。

また、PFC エマルジョン製剤添加酸素化 ST Thomas 液では、ノルエピネフリン放出量が他群に比して有意に少量であった。このノルエピネフリン放出抑制は、本研究班の他の研究により、carrier-mediated なものである可能性が強く、前者では酸素供給

が保たれた結果、交感神経終末の ATP sensitive なノルエピネフリン放出機構が正常に機能することができたためと考えられる。

本研究により、脳死心移植時には、doner 心を摘出して保存する段階で、前もって PFC エマルジョンを添加し、酸素化した 4°C の ST Thomas 液に浸し、密封して輸送した場合は、現在よりも window period を延長できる可能性が示された。今後、さらに大型の心臓（イヌやブタ）を使用して、同様の単離移植心保護が得られるか否か検討する必要があると考えられる。

E. 結論

PFC として FC-43、界面活性剤（乳化剤）として HCO-60 を用いた PFC エマルジョンを 4°C の ST Thomas 液に添加して酸素化したものに、モルモット単離心を浸して保存することにより、加温再灌流後の心機能が保たれた。したがって、PFC エマルジョンの添加により、現在より心移植時の移植心保存の window period の延長がもたらされる可能性が示された。今後、さらに大型の心臓を用いた検討が望まれる。

F. 研究発表

1. Yutaka Makino, Michiaki Imamura, Mitsuhiro Isaka, Shoji Fukushima, Ichiro Sakuma, Kunihiko Nakai, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake, Yoshikazu Takeuchi, Osamu Kenmotsu, Keishu Yasuda: Artificial blood usage for non-transfusion cardiopulmonary bypass. Artificial Organs 2003 in press

2. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、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: 31-34, 2002
 3. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、仲井 邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、北島 顕、劔物 修 ヘモグロビン系人工酸素運搬体: 体外循環、人工血管コーティング、心筋保護等臨床応用にむけての基礎的検討 Cardiovascular Anesthesia 6: 67-71, 2002
 4. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、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: 17-20, 2002
 5. Mitsuhiro Isaka, Ichiro Sakuma, Michiaki Imamura, Yutaka Makino, Shoji Fukushima, Kunihiro Nakai, Norihiko Shiiya, Osamu Kenmotsu, Akira Kitabatake and Keishu Yasuda MD: The effects of a novel perfluorooctyle bromide emulsion administered during cardiopulmonary bypass: inflammatory reaction. Artificial Organs 2003, in press
2. 学会発表
 1. Isaka M, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Sakuma I, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K: Inflammatory Reactions Induced by an Application of Perfluorooctylbromide Protective Effects of a Novel Perfluorocarbon Emulsion Administered during Cardiopulmonary Bypass. Tokyo, 2003. 3. 4. Artificial Blood 11(1): 86, 2003
 2. Isaka M, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Sakuma I, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K: Inflammatory Reactions Induced by an Application of Perfluorooctylbromide Emulsion during Cardiopulmonary Bypass with Moderate Hemodilution. The 9th International Symposium on Blood Substitutes. Tokyo, 2003. 3. 4. Artificial Blood 11(1): 110, 2003
 3. 佐久間一郎、仲井邦彦、福島昭二、富樫廣子、菅原 武、藤井 聡、並河和彦、小田切優樹、藤堂 省、劔持 修、吉岡充弘、北島 顕: 臨床応用を目的とした人工赤血球の開発. 第9回日本血液代替物学会年次大会、熊本、2002. 9. 4.
 4. 北島 顕、佐久間一郎、藤井 聡、吉岡充弘、富樫廣子、仲井邦彦、藤堂 省、劔物 修、安田慶秀、福島昭二、小田切優樹、並河和彦: 臨床応用をめざした人工赤血球の開発. 第2回産学連携フォーラムー医学2002、東京、2002. 12. 18.
- G. 知的所有権の出願・登録状況
- 米国特許 (米国出願 09/499758) および欧州特許 (00102156.7) について申請中であり、最終審査段階となった。関係当局と協議中である。