

厚生労働科学研究費補助金  
－平成15年度 医薬安全総合研究事業－

# ヘモグロビンアロステリーを利用した付加価値赤血球製剤の創製と 救急医療への応用

(研究課題番号：H15-医薬-011)

総括研究報告書

主任研究者 末 松 誠  
慶應義塾大学医学部 教授

平成16(2004)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

平成 15 年度 医薬安全総合研究事業

ヘモグロビンアロステリーを利用した付加価値赤血球製剤の創製と  
救急医療への応用  
(研究課題番号: H15-医薬—011)

総括研究報告書

..... 研究組織 .....

主任研究者

末松 誠                      慶應義塾大学医学部                      教授

分担研究者

堀 進悟                      慶應義塾大学医学部                      助教授  
酒井 宏水                      早稲田大学理工総研                      助教授  
加柴 美里                      慶應義塾大学医学部                      助手

研究協力者

Takashi Yonetani                      Professor, Department of Biochemistry & Biophysics,  
University of Pennsylvania

Antonio Tsuneshige                      P, Department of Biochemistry & Biophysics,  
University of Pennsylvania

## 総括研究報告書：目次

### I 総括研究報告書：

研究総括 末松 誠 慶應義塾大学医学部 7

### II 分担研究報告書：

1. 堀 進悟 慶應義塾大学医学部 助教授 19

2. 酒井 宏水 早稲田大学理工総研 助教授 23

3. 加柴 美里 慶應義塾大学医学部 助手 27

### III 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV 研究成果の刊行物・別冊

# I 総括研究報告書

## 平成 15 年度 医薬安全総合研究事業

### ヘモグロビンアロステリーを利用した付加価値赤血球製剤の創製と 救急医療への応用 (研究課題番号: H15-医薬—011)

#### 主任研究者

末松 誠

慶應義塾大学医学部

教授

#### 分担研究者

堀 進悟 慶應義塾大学医学部 助教授

酒井 宏水 早稲田大学理工総研 助教授

加柴 美里 慶應義塾大学医学部 助手

#### .....平成 15 年度 研究総括.....

救急救命に必要な酸素輸液の開発研究はこれまで期限切れ残余献血からヘモグロビンを精製し、これを生体適合性材料を用いて修飾あるいは封入した製剤の開発が主体であった。

一方、近年申請者は、赤血球が血管内の酸素濃度を感知して一酸化窒素(NO)などの低分子ガスや有機酸を活発に放出、回収を行い、その一部が血管拡張や血小板活性化制御に関与することを明らかにした。これは赤血球が酸素運搬や酸塩基平衡の調節に関与するだけでなく、積極的に微小循環血流を維持し、酸素供給の低い領域に選択的に酸素供給を行っている可能性を示している。換言すれば、精製ヘモグロビン修飾体による人工酸素運搬体では赤血球

が本来保持しているこのような付加価値機能を完全に補完することはできないことを意味している。このような血管作動物質のシンクリザーバーとしての赤血球の血管機能制御の分子機構解明は、特にショックの救急救命への応用を考える上で極めて重要であり、細胞膜機能を維持したまま、高い酸素運搬能と微小循環血流保持機能を付与した新しい赤血球製剤開発が可能となったことを意味している。本研究は膜透過性の高い低分子ガス(NO, CO)による蛋白質機能修飾技術を利用した赤血球保存技術の向上と付加価値添加技術により、篤志で得られた献血血液の有効利用を目的とする。

(1) 付加価値赤血球の創製に関する成果:metabolome 解析による検討

付加価値赤血球製剤を開発するにあたり、平成 15 年度の本研究によりきわめて重要な実験知見が得られた。その最も重要なものは、血液体積の50%

を占める赤血球が単なる酸素運搬体として働くばかりでなく、微小循環局所の酸素分圧変化や shear stress を感知して血管拡張物質を放出したり、血管収縮物質を吸収したりする metabolic sink として作用していることが明らかにされたことである。

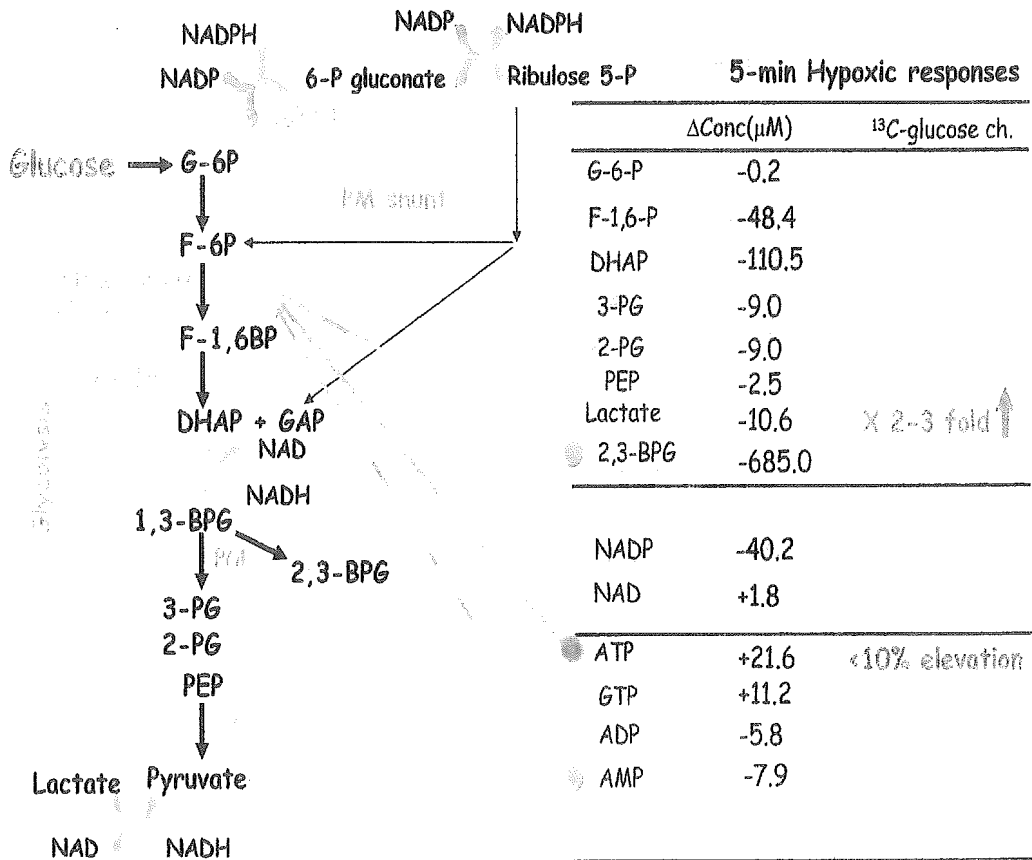


図 1 ヒト赤血球の低酸素暴露時のメタボローム解析(解糖系・Pentose Monophosphate Shunt を中心に)。5 分間の無酸素状態で解糖系生成物の濃度が低下し、ATP、GTP が増加、AMP が減少した。 $^{13}\text{C}$ -glucose の tracer study でラベルされた乳酸の生成速度の増加も確認された。解糖系の加速が起きていることが示唆されるが、基質濃度が低下し、allosteric effector (BPG, ATP, AMP) はすべて phosphofructokinase (PFK) を阻害する方向に変動していることから、解糖系の加速を説明するためには、数分の間に機能的酵素の絶対量が増加する以外に説明できないことが判明し、酸素濃度の変動により Hb が構造変化をきたすと、PFK が赤血球膜のなんらかの蛋白質と脱着する可能性を考えた。

Hb allostery による赤血球機能修飾メカニズムの解析については Hb 四次構造変化が赤血球細胞内代謝に与える影響を網羅的に解析する為、Hb 分子機能修飾に伴い細胞内外で変動する metabolite を、分子量 70-1000 の有機分子を一斉解析できる高性能のキャピラリー電気泳動/質量分析装置 (CE-MS) を駆使して網羅的に定量分析し (図1:メタボローム解析法)、種々の微小血管レベルの環境でどのような代謝産物の放出が起るかを系統的に分析同定した。

図 1 は赤血球を低酸素に暴露した際の代謝物濃度の網羅解析データのうち、解糖系とその周辺の代謝物の変化を示す。解糖系の基質濃度は軒並み低下し、ATP が増加、AMP が低下してエネルギー生成が増加することが判明した。一方主要な allosteric effector の変動を見ると、ATP の増加、AMP の低下、2,3-BPG の低下など PFK を律速プロセスとする解糖系速度が低下するような変化を示していた。

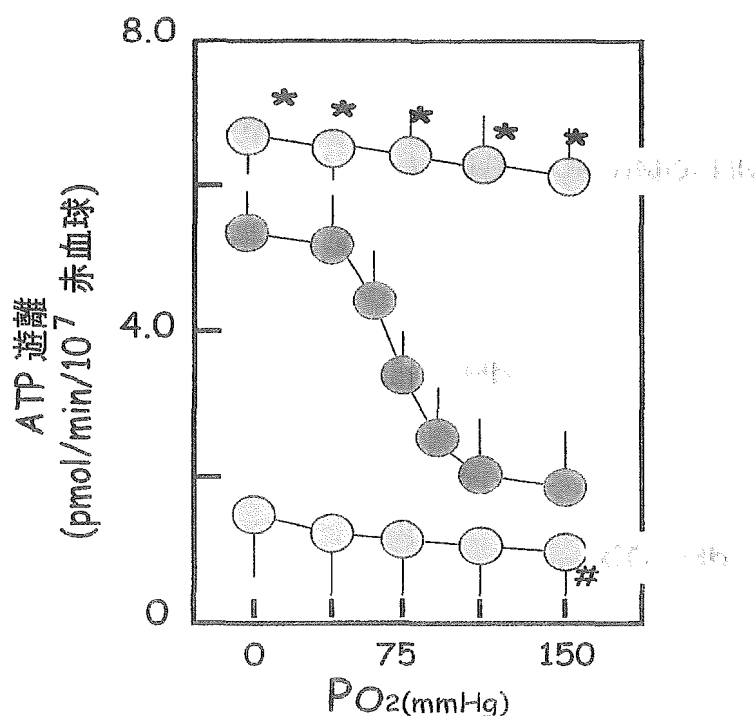


図2 ヒト赤血球の低酸素性 ATP 放出現象と CO による抑制および NO による活性化。脱酸素化した赤血球のヘム含量の半分量に相当する量の NO を添加するとすべて alpha subunit に配位して deoxyHb が安定化する (図 3 参照)。

したがって、メタボローム解析の成績を論理的整合性をもって説明するためには、数分間に機能的酵素の絶対量が増加させるメカニズムが必要になる。

一方図2に示すように、低酸素により細胞内で急速に生成された ATP は一部が細胞外に放出されていることも明らかになった。ATP は細胞外に放出されると血管内皮細胞表面のレセプタに結合し、細胞内カルシウムを増加させ、NO 合成を増加させることにより血管拡張をもたらすことが知られている。この ATP 放出のプロファイルが S 状になっていることから我々は酸素濃度の変動によりヘモグロビンの構造変化が生じ、なんらかのメカニズムで細胞内の ATP が増加し、その一部が細胞外に放出されたものと考え、ヘモグロビン heme の構造を R-state (6 配位) で安定化させる CO を処理した赤血球、あるいは T-state (5 配位) で安定化させる NO を処理した

赤血球を用いた実験もあわせ施行した (図3)。

CO-RBC では低酸素性の ATP 放出は略完全に抑制された。一方、deoxy Hb を有する赤血球にヘム濃度の 0.5 当量の NO donor (GS-NO) を添加し、NO を alpha subunit のヘムに配位させ、alpha-NOHb RBC 調整法を確立した。NO の配位状態は電子スピン共鳴法で検証し、特有の triplet signal を有する 5 配位のヘム構造が確認された (図4) (末松、堀)。この alpha-NO Hb を有する赤血球は CO-Hb とは対照的にいかなる酸素濃度の条件下でも ATP を放出している状態にあることが確認された。NO の配位は T-state の安定化をもたらし、酸素乖離曲線を右方偏移させ酸素乖離を促進することになるが、同時に ATP 放出を活性化することにより、血管内皮細胞の NO の増加をもたらす可能性があり、ショックの治療法への応用を考えた。

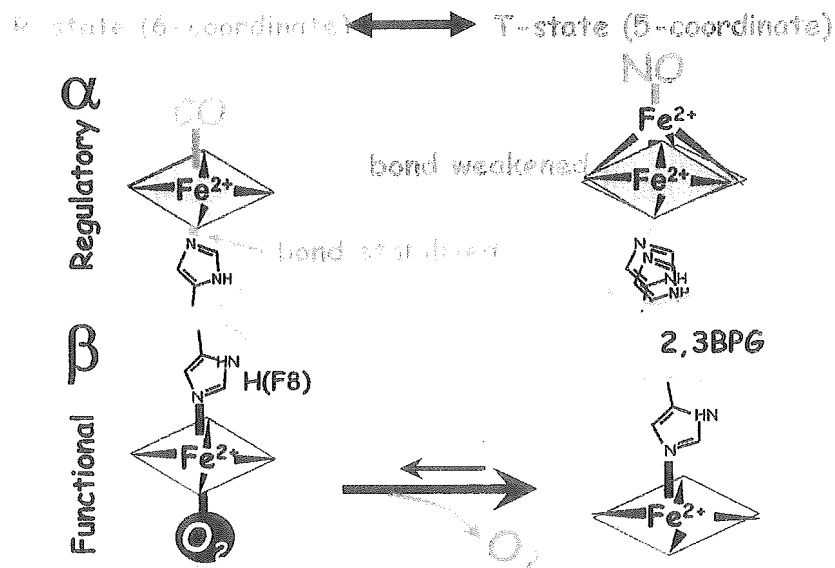


図3: COによるHb R-state (6-coordinated form)の安定化とNOによるT-state (5-coordinated form)の安定化。



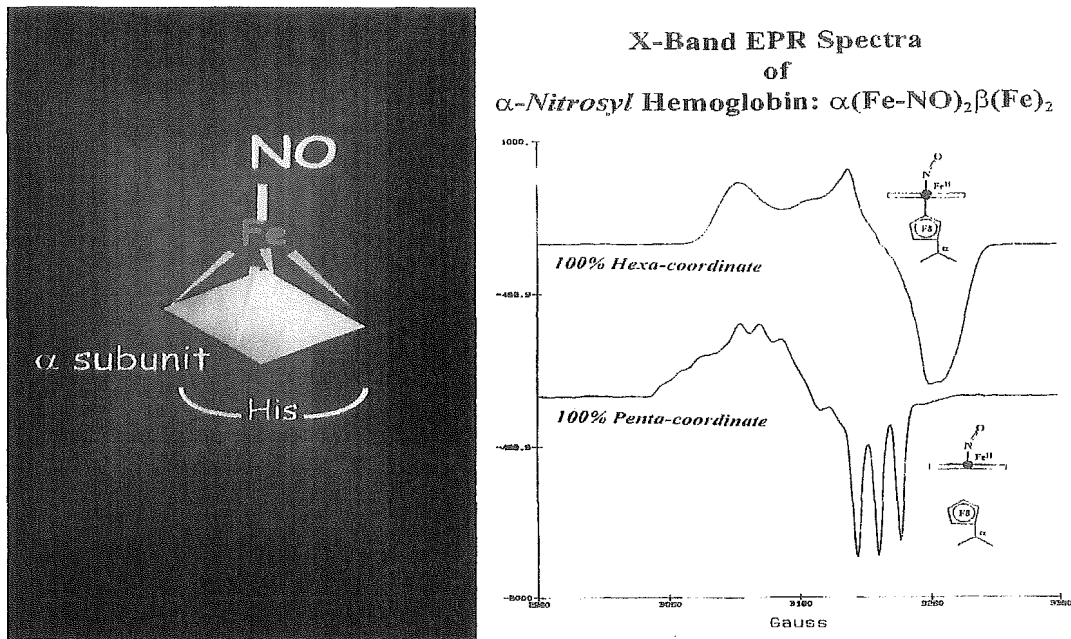


図4 調整した alpha-NO Hb 含有赤血球における hemoglobin のへム構造の EPR による検証。5配位のへムの特徴である triplet signal が確認できる。

Alpha-NO RBC のショック治療への応用を検討するために血液量の40%を脱血後蘇生を行うモデルを用い、肝臓微小循環障害の改善効果、および胆汁分泌回復効果を指標として検討を行った。図5に示すように alpha-NO Hb を有する赤血球はショックの結果生じる肝臓の微小循環障害や胆汁分泌低下に通常の赤血球では認められないような著明な改善効果を認めるだけでなく、全身の代謝性アシドーシスに対して劇的な改善作用を示す。これは Hb allostery を T-state で安定化させるとなんらかの機序で赤血球が酸塩基平衡能を活性化させる可能性があることを示唆しており、現在鋭意その分子基盤を検討している

(末松)。

以上の知見より、付加価値赤血球 (alpha-NOHb) は Hb からの酸素放出を効率化するとともに、微小循環の改善作用が期待され、救急救命領域への応用が期待される。本付加価値赤血球の救急救命領域への応用を目的として、実験系の確立を行った。酸素放出効率の評価系を確立する為、(1)出血性ショックの代謝指標の検討、(2)心拍出量測定 of 検討、(3)右心房における静脈血酸素飽和度の測定を試みた結果、代謝指標として乳酸の有用性が示された(堀)。

この研究は血液製剤を投与される個体のへム解毒の負担を軽減できるメリッ

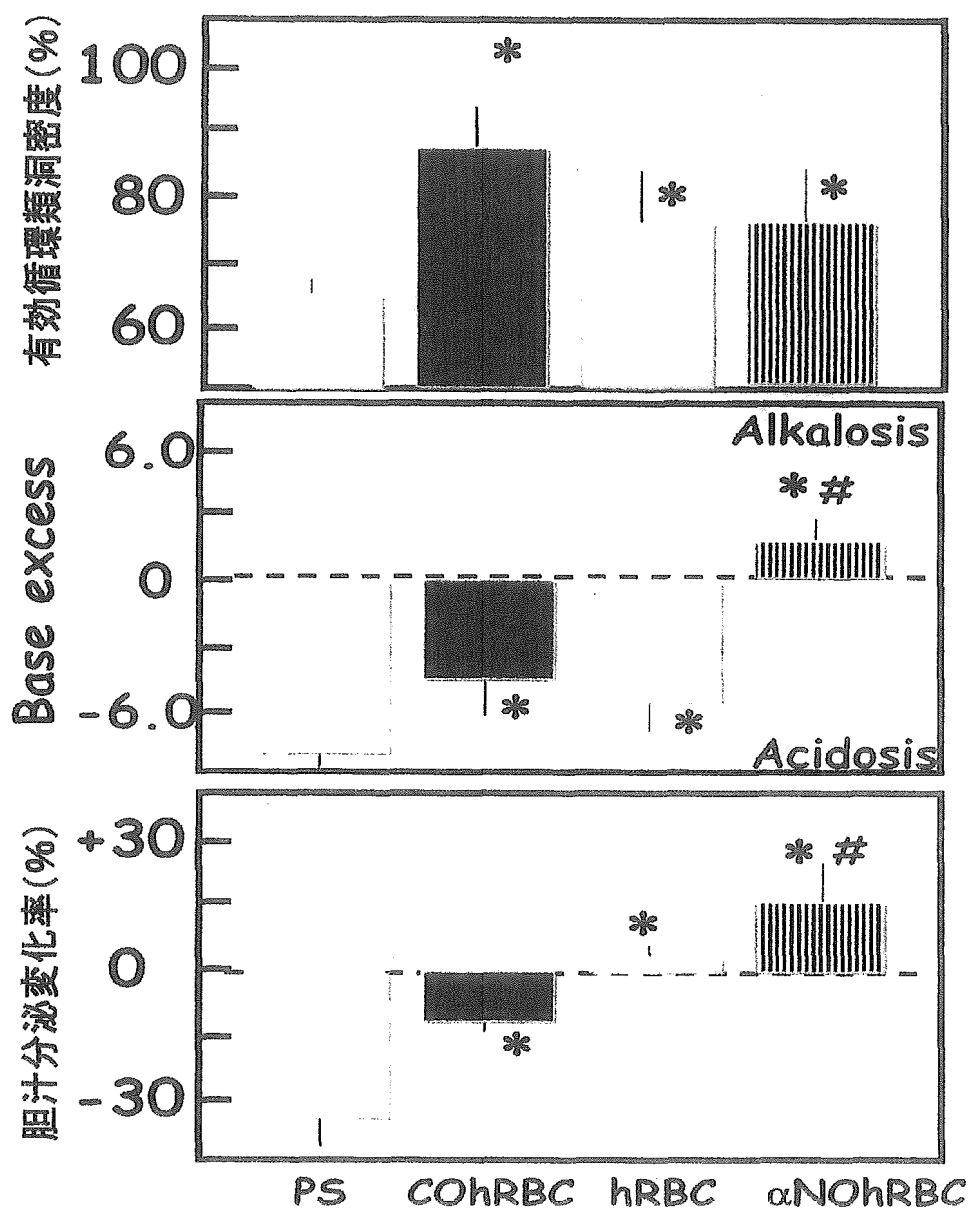


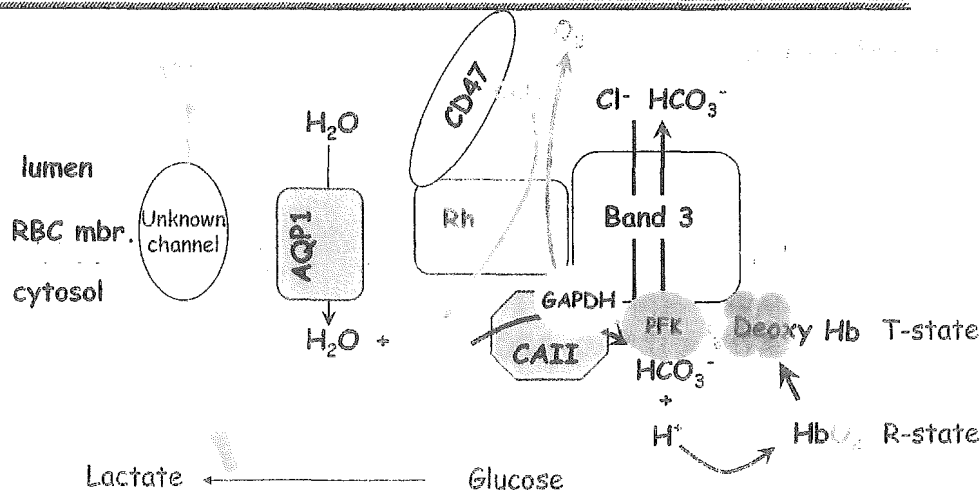
図5 alpha-NOHb 含有赤血球による出血性ショックによる肝臓微小循環機能の回復効果。最上段は functional sinusoidal density, 中段は動脈血での base excess, 最下段は胆汁分泌回復率を示す。Alpha-NO RBC には著明な酸塩基平衡是正作用がある。

トも見逃せない。正常個体と異なり、外科手術後やショック病態ではサイトカイン血症や低酸素ストレスによりヘム解毒酵素である heme oxygenase が誘導され、ヘムからビリルビンへの分解が異常に亢進することから、酸素輸送量あたりのヘムの絶対量を低下させることは、単に血液資源の節約という観点のみならず、それを投与される個体の高ビリルビン血症のリスクを軽減させることにつながるからである。老化赤血球は最終的に脾臓にて捕足代謝されることが知られているが、保存赤血球の体内動態や代謝過程に関する報告は以外と少ない。本付加価値赤血球のヘム解毒の負担へのメリットを検討するための基盤データとして、初年度は、血液保存液を加えて1週

間保存したラットの赤血球を用い、ラットの循環血液量の 40 %を交換し、脾臓の挙動を中心に解析を行った。脾臓重量が3-7日後に約 1.5 倍に顕著に増大し、また 14 日後にはヘモデリンが認められ、相当量の保存赤血球が脾臓にて捕足代謝されていることが示唆された(酒井)。

以上が H15 年度の研究実績であるが、本年度の研究を通じて得られた知見と、過去に報告されている知見を総合して想定される Hb allostery による赤血球機能の制御機構の作業仮説を図 5 に示す。Hb は酸素の脱着により、膜蛋白である Band III への affinity を変化させることが 1984 年に研究協力者の Tsuneshige らにより明らかにされている。

Microvascular surface  
Hypoxia-induced NO-dependent vasodilation?



Hb allostery dictates not only tissue O<sub>2</sub> delivery but also vascular patency and O<sub>2</sub>-independent regulatory mechanisms in organs

図6 赤血球の Band III-Hb 相互作用を介した細胞機能調節機構の作業仮説。Bohr effect は低酸素、CO<sub>2</sub>による酸素乖離の活性化と ATP の放出を介した血管拡張作用の双方による酸素運搬の活性化として理解できる可能性が提示された。

(J Biochem)。興味深いことに Band III の細胞内ドメインの Hb の結合部位近傍には、複数の解糖系酵素： PFK, Aldolase, GAPDH) の結合部位が存在しており、酸素濃度の低下により Hb が結合することにより、これらの酵素が乖離して活性化される可能性がある。また Band III には carbonic anhydrase II の結合部位が知られており、この酵素は結合型の活性が増加するとの報告がなされている。Hb の T-R transition によってこれらの酵素群が Band III の周辺

で metabolon を形成して酸素運搬と pH 調節を効率よく促進する可能性の検証を今後進めていくと同時に、NO 以外の T-state stabilizer による赤血球機能修飾の可能性を検討する予定である。また CO による修飾は赤血球の解糖系の消耗を低下させることが明らかになったため、今後この知見を献血赤血球の低温保存の quality 向上に生かせるかどうかを検討していく予定である。

.....

## (2) 虚血性臓器障害の生体内評価システムの確立に関する成果

平成 15 年度の本研究では付加価値赤血球製剤の生体内投与による臓器機能改善効果を定量的に評価できるようにするための各種の生体計測系の確立を一方で行った。特に肝臓では酸素の低下は肝臓実質細胞からの胆汁分泌の低下を招来し、虚血後の肝障害の重要な増悪因子となることが知られている。このような肝臓実質細胞の機能低下の評価システムとして、ATP 要求性の ABC transporter を介した organic anion transport の定量的解析法を確立した(文献1)。また ischemia-reperfusion のみならず endotoxemic shock は付加価値赤血球製剤の適応疾患として重要であるが、この両者の病態進展機構に共通して Kupffer cell から生成される thromboxane A<sub>2</sub> が重要な役割を果た

すことが明らかになった。現在のところ thromboxane が低酸素や内毒素暴露を契機にどのようにして生成増加が起こるかは不明であるが、今後 alpha-NO RBC 投与によりこれらの mediator の生成増加が抑制されるか否かについて引き続き検討する予定である。

## 研究業績

1. Kudo A, Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y, Uchida K, Arie S, and Suematsu M. Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver *Hepatology*. In press, 2004.
2. Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematsu M, Yamashina S, Murata T, Narumiya S, Kakita A, and Majima M. Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology*. 39: 139-150, 2004.
3. Nagano S, Shimada H, Tarumi A, Hishiki T, Kimata-Arigo Y, Egawa T, Suematsu M, Park SY, Adachi S, Shiro Y, and Ishimura Y. Infrared spectroscopic and mutational studies on putidaredoxin-induced conformational changes in ferrous CO-P450cam. *Biochemistry*. 42:14507-14514, 2003.
4. Suematsu M, Sukanuma K, Kashiwagi S. Mechanistic probing of gaseous signal transduction in microcirculation. *Antioxid Redox Signal*. 5: 485-492, 2003.
5. Schaefer S, Kajimura M, Tsuyama S, Uchida K, Sato E, Inoue M, Suematsu M, and Watanabe K. Aberrant utilization of nitric oxide and regulation of soluble guanylate cyclase in rat diabetic retinopathy. *Antioxid Redox Signal*. 5: 457-565, 2003.
6. Norimizu S, Kudo A, Kajimura M, Ishikawa K, Tani H, Yamaguchi T, Fujii K, Arie S, Nimura Y, and Suematsu M. Carbon monoxide stimulates mrp2-dependent excretion of bilirubin-IXalpha into bile in the perfused rat liver. *Antioxid Redox Signal*. 5:449-456, 2003.
7. Suematsu M. Quartet signal transducers in gas biology. *Antioxid Redox Signal*. 5: 435-437, 2003.
8. Egawa T, Yoshioka S, Takahashi S, Hori H, Nagano S, Shimada H, Ishimori K, Morishima I, Suematsu M, and Ishimura Y. Kinetic and spectroscopic characterization of a hydroperoxy compound in the reaction of native myoglobin with hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 278: 41597-41606, 2003.
9. Kato Y, Shimazu M, Kondo M, Uchida K, Kumamoto Y, Wakabayashi G, Kitajima M, and Suematsu M. Bilirubin rinse: A simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. *Hepatology*. 38: 364-373, 2003.

## II 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

付加価値赤血球の救命領域への応用に関する実験的検討

（分担） 堀進悟 慶應義塾大学医学部救急医学

**研究要旨** 小動物を用いて、付加価値赤血球・輸血療法の救急救命領域における有用性を検討するための基礎的検討を行ない、代謝指標として乳酸の有用性が示された。付加価値赤血球の効率的酸素放出の *in vivo* での評価法に関して、技術的困難性が示唆された。

**A. 研究目的**

本邦では、年間1万人を超える外傷死を認め、その多くは出血性ショックによる。これらの患者は短時間のうちに、数Lから10Lを越える大量輸血を受けるが、出血、あるいは多臓器障害のために死亡する。死亡の誘因として、侵襲にともなう全身の血管収縮のため、輸血の組織への酸素供与が改善しないことが関係している。付加価値赤血球（ $\alpha$ NOヘモグロビン）はヘモグロビンからの酸素放出を効率化するとともに、微小循環の改善作用が期待され、救急救命領域への応用が期待される。

本研究は、付加価値赤血球の救急救命領域への応用を目標として、基礎的検討を行う実験系を確立することを目的とする。

**B. 研究方法**

付加価値赤血球（ $\alpha$ NOヘモグ

ロビン）を用いた動物実験には、以下の問題が含まれる。

1)  $\alpha$ NOヘモグロビンの精製にともなう動物種の制限

ヒトへの臨床応用を検討する輸液・輸血療法モデルでは、ブタなど大動物による実験が求められる。しかし、現段階では $\alpha$ NOヘモグロビンの精製量に制限があるため、ラットなど小動物を用いる必要がある。本研究では、Wistar ratを対象とした。

2) 従来的人工赤血球の *in vivo* 評価方法との差異

従来 of 非細胞型人工ヘモグロビンの評価研究では、対照を細胞外液によるクリスタロイド輸液あるいは蛋白添加により膠質浸透圧を上昇させた輸液を用い、その効果を比較して人工赤血球の効果を示した。しかし、付加価値赤血球の検討では、対照は native の赤血球でなければな

らず、赤血球（あるいは全血の）大量輸血に対して、付加価値赤血球の大量輸血の効果を評価する実験系が求められる。

### 3) 酸素放出効率の評価

$\alpha$ NO ヘモグロビンはアロステリー効果により微小循環系において酸素を効率的に放出し、組織の酸素化を改善する可能性が指摘されているが、*in vivo* では確認されていない。また、酸素放出の効率が上昇した場合に、生体の酸素消費量が一定とすれば、心拍出量、さらには全身臓器の血管抵抗に影響を与える可能性がある。

以上の問題点を検討するために、Wistar rat（7週齢、約 200g）を用いて、以下の基礎的検討を行った。

#### ① 出血性ショックの代謝的指標の検討

Wistar rat (N=4) にペントバルビタール腹腔内麻酔 (50mg/kg) を行い、左頸動脈に動脈ラインを留置して血圧測定、右内頸静脈に脱血用カテーテルを留置、さらに食道温度をサーミスターにより測定した。内頸静脈より全血の 40% を脱血し、PBS により置換した。さらに別のラットを用いて (N=3) 10% ずつ血液を置換して全血の 90% の脱血・置換を行った。血行動態測定とともに、動脈血液ガス、乳酸、電解質、ヘモグロビン、Hct など測定した。

#### ② 心拍出量測定の検討

文献検索では、ラット出血性

ショックモデルで心拍出量の測定が行われた例は少なく、その理由として大動物では安定して測定される熱希釈法による心拍出量の測定の精度が低下することが考えられた。海外で既報の装置が国内で未販売のため、時定数の小さいカテーテル型サーミスターを大動脈に留置し、内頸静脈から冷水を注入して希釈曲線を描出する実験を試みた。

また熱希釈以外の方法による心拍出量測定法を検討した。

#### ③ 中心静脈（右心房）における静脈血酸素飽和度の測定

酸素放出能力の高い  $\alpha$ NO ヘモグロビンを急速に輸血した場合に、混合静脈血酸素飽和度は一過性に低下する可能性があり、この現象を計測できれば、*in vivo* における効率的酸素放出の証明となる。ラット右心房にカテーテル型酸素電極を留置し、混合静脈血の酸素飽和度の測定を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究は、ラットを対象とした急性実験であり、ペントバルビタール腹腔内麻酔を行ったうえで、実験操作を行っているので、動物愛護上の配慮に問題はない。

## C. 研究結果

#### ① 出血性ショックの代謝的指標の検討

40%脱血・置換モデルでは血圧は  $100 \pm 17$  mmHg から脱血置換直



後には  $55 \pm 6$  mmHg に低下、30 分後に  $70 \pm 13$  mmHg に回復した。これにともない Hct は  $43 \pm 3\%$ 、 $32 \pm 2\%$ 、 $31 \pm 3\%$  と低下し、乳酸値は  $0.92 \pm 0.17$  mM、 $2.60 \pm 1.10$  mM、 $2.03 \pm 1.02$  mM と増加した。他の代謝的指標には変化を認めなかった。90% 脱血・置換モデルでは血圧は  $92 \pm 21$  mmHg から脱血置換直後には  $57 \pm 7$  mmHg、30 分後に  $36 \pm 7$  mmHg と低下した。これにともない Hct は  $47 \pm 2\%$ 、 $19 \pm 1\%$ 、 $25 \pm 1\%$  に低下した。乳酸値は  $0.79 \pm 0$  mM、 $8.87 \pm 2.02$  mM、 $15.55 \pm 3.25$  mM と著明に増加した。他の代謝的指標には変化を認めなかった。以上より、ラット出血性ショックの代謝指標として乳酸測定の有用性が示唆された。

## ② 心拍出量測定の検討

理論計算から、熱希釈法によるラット心拍出量測定には 50ms 以下の時定数が必要と考えられたが、国内サーミスターメーカーの製品では、この規格を満たす細径サーミスターが得られず、これに近い性能を有した 2 社のサーミスターを大動脈基部に留置して内頸静脈から冷水を注入して希釈曲線を描出する実験を試みた。しかし、心拍出量の測定可能な熱希釈曲線は得られなかった。このため、米国から PowerLab 社製 Cardiac Output System (Model No. ML750B10) を輸入し、さらに検討する予定である。また熱希釈以外の方法による心拍出量測定に関して検索を行ったが、開胸など、侵襲度の大きい実験となる欠点が考

えられた。そこで、左心室に留置したカテーテルから非放射性マイクロスフェア注入し、全身臓器に塞栓されたマイクロスフェア数を測定し、相対的血流量を測定する方法を検討中である (Yamashita K et al. Pathophysiology 3:149-156, 1996)。

## ③ 中心静脈 (右心房) における静脈血酸素飽和度の測定

ラット右心房にカテーテル型酸素電極を留置し、混合静脈血の酸素飽和度を試みたが、電極先端が血管壁あるいは右心房壁に付着するため、安定した測定値を得られなかった。

## D. 考察

ラットを用いて、付加価値赤血球による大量輸血の有用性を検討するには、native の赤血球輸血を対照として、検討を行うことが必要である。出血、輸血にともなう代謝指標として、乳酸値は有用と考えられた。

ラットの心拍出量測定に関して、さらに予備実験を要する。混合静脈血酸素飽和度の測定に関しては、現時点の技術では困難と考えられた。

## E. 結論

付加価値赤血球の救急救命領域への応用を検討するため、小動物による実験系を確立するための基礎検討を行った。血行動態以外のショックの代謝指標として、乳酸値の有用性が示された。小動物における心拍出量など、付加価値赤血球の特徴を評

価するため、さらに検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

1. 出血ショック蘇生試験による赤血球の酸素運搬機能評価  
2. 保存赤血球投与の脾臓に対する影響

分担研究者 酒井 宏水 早稲田大学 理総研 助教授  
研究協力者 土田 英俊 早稲田大学 名誉教授 / 理総研 顧問研究員

**研究要旨：**(1) 赤血球の機能評価法として、出血ショック状態のラットに、脱血液または洗浄赤血球をアルブミンに分散させた溶液を投与し 6 時間観察した。循環動態、血液ガス組成は安定に保持され、また、右頸動脈結紮の影響により生起する虚血性障害を低減する効果が見い出され、付加価値赤血球など酸素運搬体の評価系に利用できる可能性が示唆された。(2) 老化赤血球は最終的に主に脾臓にて捕捉代謝されるが、保存赤血球の体内動態や代謝過程に関する報告は意外と少ない。これを検討するため、血液保存液(CPDA-1)を加えて 1 週間保存したラット赤血球を用い、ラットの循環血液量の 40%を交換した。脾臓重量が 3~7 日後に約 1.5 倍に顕著に増大し、また 14 日後にはヘモジデリンが認められ、相当量の保存赤血球が脾臓にて捕捉代謝されていることが示唆された。

## 1. 出血ショック蘇生試験による赤血球の酸素運搬機能評価

## A. 目的

赤血球の酸素運搬機能評価法として、出血ショック状態としたラットに、脱血液または洗浄赤血球をアルブミンに分散させた溶液を投与し、蘇生の効果を 6 時間観察するモデルを作成することを目的とした。

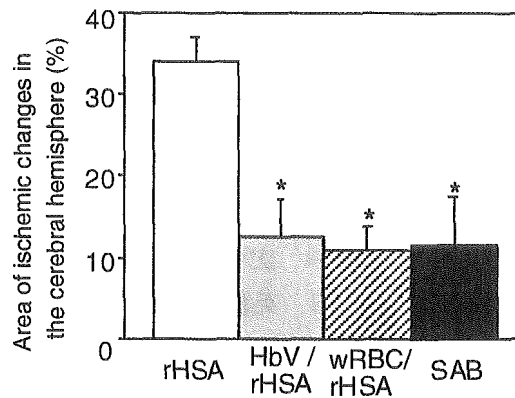
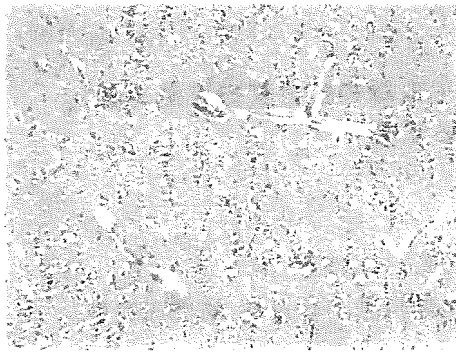
## B. 方法

Sevoflurene 麻酔下、Wistar 系雄性ラットの右頸動静脈に挿管し動脈より循環血液量の 50%を脱血。15 分経過してから蘇生液を投与し、血圧と血液ガス組成の推移を観察した(n = 8)。また、6 時間経過後犠牲死させ、脳の組織病理学的検討を行った。蘇生液としては、5%リコンビナントアルブミン(rHSA)溶液、脱血液(SAB)、洗浄ラット赤血球(wRBC/rHSA)、人工赤血球を rHSA に分散させたもの

(HbV/rHSA)を対象とした。

## C. 結果および考察

蘇生液を投与しない場合は 1 時間以内に全例死亡するが、rHSA を投与した場合、8 匹中 2 匹が 6 時間を待たずに死亡した。また、血圧と血液ガスパラメータは完全に回復しなかった。SAB、wRBC/rHSA または HbV/rHSA 群は全例が生存し、また各パラメータは脱血前と同等のレベルにまで回復し、6 時間安定であった。ALT, AST は rHSA 群で低い値となったが、酸素運搬機能を有する蘇生液を投与した場合には高値となり、再灌流障害が生起したと考えられた。他方、右頸動脈結紮の影響により、右脳に虚血性障害(浮腫、核濃縮)が全例で認められた (Fig. 1)。特に rHSA 群は断面積の約 34%が虚血性障害を示したが、酸素運搬機能を有する蘇生液を投与した群では 11~13%に留まり、脳に対しては酸素運搬効果が有利に働いた。



**Fig. 1:** The cerebral hemisphere on the right side of the rHSA group showed significant ischemic changes, a pyknotic change of the nuclei and an edematous change ( $34 \pm 3\%$  of the total section area) as shown in the left picture, relating to the ligation of the right carotid artery. However, the other groups that were resuscitated with  $O_2$ -carrying fluids showed minimal changes ( $* p < 0.001$  vs. rHSA; HbV/rHSA,  $13 \pm 5\%$ ; SAB,  $11 \pm 6\%$ ; wRBC/rHSA,  $11 \pm 3\%$ ). The non-resuscitated rats did not show such ischemic changes.

#### D. 結論

本実験で確立された出血ショック蘇生モデルを利用し、一酸化炭素(CO)結合-赤血球および高酸素親和度の人工赤血球など、付加価値赤血球について比較試験が行える。

## 2. 保存赤血球投与の脾臓に対する影響

#### A. 目的

老化赤血球は最終的に主に脾臓にて捕捉代謝されることが知られているが、保存赤血球の体内動態や代謝過程に関する報告は意外と少ない。将来的に付加価値赤血球もこれらを検討することが必要になると考えられる。本研究では、予備的検討として血液保存液(CPDA-1)を加えて1週間保存したラット赤血球を用い、ラットの循環血液量の40%を交換し、脾臓の重量測定と組織病理学的検討を行い、人工赤血球の場合と比較することを目的とした。

#### B. 方法

##### 保存赤血球分散液の調製法:

Sevoflurane(1.5-2.0%)麻酔下、Wistar系ラット(体重 400-500g)の右頸動脈にカテーテルを

挿管。市販の血液保存液(CPDA-1, 川澄化学社製 カーミ CA, 成分:クエン酸、クエン酸ナトリウム、ブドウ糖、リン酸二水素ナトリウム、アデニン) 2 mL を 10mL シリンジに入れカテーテルに繋ぎ、急速脱血した。約 10mL 採血したところで密封して 4℃にて 1 週間冷蔵保存した。D'Almeidaらによれば、この条件で 1 週間保存したラット赤血球の性状(膜の脆弱性、ATP、DPG 産生能低下など)は、ヒト赤血球を同条件で 4 週間保存したものと同等である(Transfusion Med. 2000;10:291-303)。

保存血液は遠心分離(3000g, 10 min)して血清とパuffyコートを除く、沈降した赤血球に生理食塩水を添加して再分散させて遠心分離する操作を更に二回繰返した。次いで 5% rHSA を添加して再分散させ、再度遠心分離して上澄みを除く、再度 rHSA を添加して Hb 濃度を 8.6 g/dL に調節した。

##### 40%交換輸血試験:

Wistar系ラット(180-200g, ♂)に対し、ネンブータル腹腔内投与麻酔下、右頸動脈に挿管。1mL の脱血と 1mL の試料溶液の投与を繰返し、40%の血液を交換した。縫合して覚醒させ最長 14 日間生存させた。血液交換後 1, 3, 7, 14 日後に犠牲死させ、血液学的、血液生化学的検査、脾臓重量の測定、組織病理学的検討(H/E 染色、Berlin Blue 染色)を行った。