

セチルデューテロポルフィリンの pK_3 (3.3) はプロトポルフィリンの値 (4.8) に比べて小さく、ビニル基からアセチル基への変換が酸素親和性を低下させたものと考えられる。

D. 結論

以上の結果から、プロピオン酸側鎖がメチル基よりもエチル基、軸塩基としてはイミダゾリルアルキル基よりもヒスチジルグリシル基のほうが、安定な酸素錯体を与えることが明らかとなった。酸素親和度については、置換基の変換による大きな差は認められなかったが、3,8-位側鎖をビニル基からアセチル基に変換すると、1/4 に低下することがわかった。アルブミン-プロトヘム系は赤血球に比べ酸素親和度が高いことから、例えば腫瘍低酸素領域の酸素化などに有効であると考えられる。

参考文献

- 1) E. Tsuchida et al., *Bioconjugate Chem* **10**, 82-86 (1999).
- 2) T. Komatsu et al., *Bioconjugate Chem.* **12**, 71-75 (2001).
- 3) A. Nakagawa et al., *Chem. Lett.* **32**, 504-505 (2003).
- 4) T. Komatsu et al., *Bioconjugate Chem.* **13**, 397-402 (2002).

2. 還元剤投与によるヘモグロビン(Hb)小胞体の metHb 生成抑制

A. 研究目的

Hb 小胞体の生体内でのメト化促進の主要因子として、二分子膜透過性のある過酸化水素 (H_2O_2) が考えられている。本研究では H_2O_2 消去能をもつアスコルビン酸 (AsA) を用いて *in vivo* におけるメト化抑制を目的とした。さらに、二分子膜透過性還元剤であるシステイン (Cys) によるメトヘモグロビンの還元も検討した。

B. 研究方法

1. AsA を用いた Hb 小胞体の *in vivo* メト化抑制

1.5 %セボフレン麻酔下、Wistar 系ラット (体重約 250 g、 $n = 4$) の大腿静脈に挿管した。Hb 小胞体 (HbV, [Hb] = 10 g/dL、20 mL/kg) を投与した後、AsA 溶液 (0.1、0.25、0.5、1.0 wt%) を連続投与 (投与速度 2.1 mL/hr) した。経時的に採血した血液を 6 hr まで測定した後、遠心分離 (12,000 rpm、5 min)、超遠心分離 (40,000 rpm、30 min) にて Hb 小胞体を沈殿させ、メト化率を metHb (405 nm)、deoxyHb (430 nm) の吸光度比から算出した。また、同条件にて AsA 溶液を連続投与したラットの血液を採血し、AsA 濃度を定量した (BML 社に依頼)。

2. システインによるメトヘモグロビンの還元

Hb 小胞体 ([Hb]=10 g/dL、20 mL/kg、メト化率約 30%) を投与後、大腿静脈より AsA (投与速度 8.4 mg/kg/hr) とシステイン (Cys, 投与速度 0.14、7.2 mg/kg/hr) を連続投与した。経時的に採血後、ヨードアセトアミド添加により Cys を失活させ、metHb (405 nm)、deoxyHb (430 nm) の吸光度比からメト化率を算出した。

C. 結果および考察

1. AsA を用いた Hb 小胞体の *in vivo* メト化抑制

ラット大腿静脈より生食 (コントロール群) および 0.25 wt% AsA 溶液 (AsA 群) を投与した際の Hb 小胞体のメト化速度は各々 4.9 と 3.6 [%/hr] であり、外挿により見積もった $T_{1/2}$ は各々 10 と 18 [hr] であった。ラット体内 (AsA 溶液投与前約 3.9 $\mu\text{g/mL}$) の AsA 濃度は静注開始後徐々に増加し、約 1 時間後からはほぼ一定値 (36 $\mu\text{g/mL}$) を示した (Fig.3)。このことから、ラットの血中 AsA 濃度の増加に伴って、AsA により血中の H_2O_2 が消去されたために Hb 小胞体のメト化が抑制されたと考えられる。

次に、AsA 投与速度の変化によるメト化速度の影響を検討した。生食（コントロール）群及び AsA 投与群（8.4、21、42、84 mg/kg/hr,それぞれ投与濃度 0.1、0.25、0.5、1.0 wt%に対応）を静注した。ラット体内の AsA 濃度は各投与速度に依存せず、投与開始後徐々に増加し、約 1 時間後からはほぼ一定値を示した。Fig. 4 に示すように、各投与速度における定常時の AsA 濃度は投与速度に比例していた。メト化速度は AsA 投与速度 8.4、21 mg/kg/hr では共に 3.6 %/hr と、コントロール群（4.9 %/hr）に対して 30%程度メト化速度が抑制された。他方、AsA 投与速度 42、84 mg/kg/hr では、コントロール群とメト化速度が近い値を示した。

これは、AsA による血漿中の H_2O_2 の消去によるメト化抑制効果と自動酸化による促進効果により極小値が現れたものと考えられる。また、AsA 投与によるラット体内 pH、血圧等に異常は認められなかった。

2. Cys によるメトヘモグロビンの還元

AsA 溶液連続投与(投与速度 8.4 mg/kg/hr)にてラット体内 AsA 濃度を定常値に保ったまま、ラット大腿静脈より Cys の連続投与(投与速度 0.14、7.2 mg/kg/hr)を行ったところ、Cys 投与開始後急激に Hb 小胞体のメト化率が上昇することが確認された (Fig. 5)。

投与 30 min 後のメト化率が約 45% (初期メト化速度 30 %/hr) と逆にメト化が促進した。これは、膜透過したシステインが小胞体内でメト Hb の還元よりも速く自動酸化し、Hb をメト化したためと考えられる。

D. 結論

Hb 小胞体を投与した後、アスコルビン酸を 8.4 mg/kg/hr の速度で投与することにより、約 30%のメト化抑制が認められた。これはアスコルビン酸により血中の H_2O_2 が消去されたためと考えられる。また、二分子膜透過性還元剤の Cys の連続投

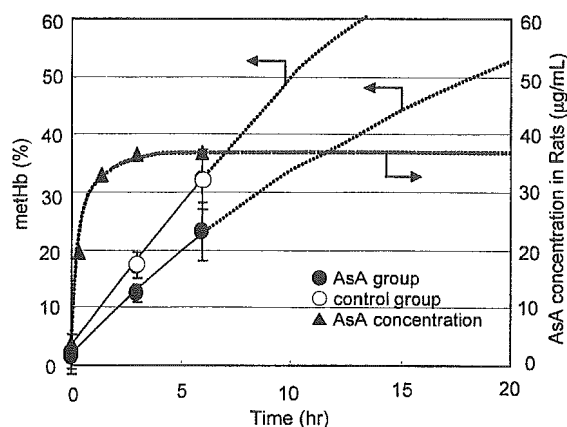


Fig. 3 Changes in the methHb percentage in Hb-vesicles with or without continuous AsA administration. The plasma AsA concentration became plateau after 5 hrs.

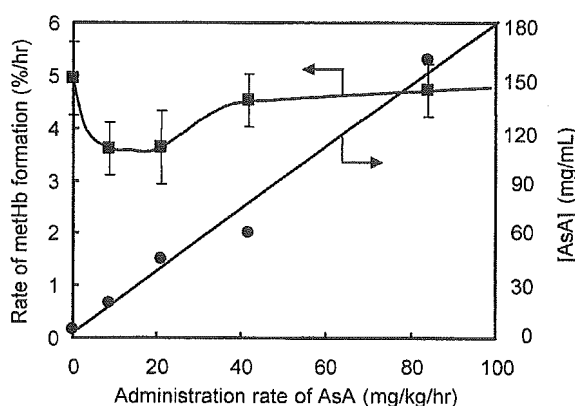


Fig. 4 Changes in the rate of methHb formation in Hb-vesicles in relation to the administration rate of AsA.

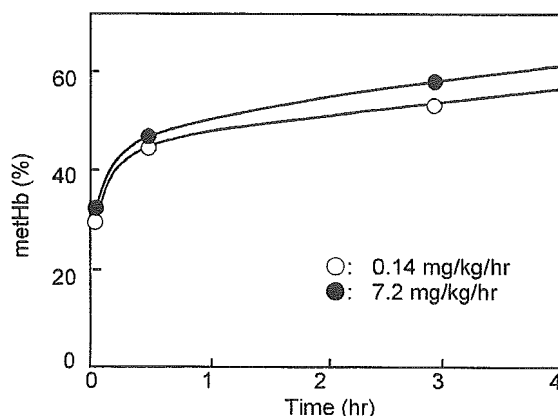


Fig. 5 Changes in the methHb percentage in Hb-vesicles by continuous administration of AsA (8.4 mg/kg/hr) with Cys (○:0.14 or ●:7.2 mg/kg/hr).

与では、逆にメト化の促進になることを明らかにした。

3. チロシンを利用したヘモグロビン(Hb)小胞体の自動酸化抑制

A. 研究目的

高純度 Hb 溶液をリン脂質二分子膜にて被覆した Hb 小胞体は metHb に自動酸化するので、これを抑制することが課題である。本研究では、L-チロシン(L-Tyr)を用いた小胞体内 Hb の非酵素的な自動酸化の抑制を目的とした。

B. 研究方法

1. L-, D-Tyr による Hb 溶液の自動酸化抑制

L-, D-Tyr (0, 100, 500, 1000 μM)を添加した 5 g/dL Hb 溶液 ([heme] = 3.1 mM, PBS (pH 7.4)) を 37°C、酸素分圧 40 Torr にて振とうし、経時的にサンプルを採取し、シアノメト Hb 法により met 化率を算出した。

2. L-Tyr 含有ジペプチド及びカタラーゼ添加効果

カタラーゼ (50000 unit/mL)、L-Tyr (250 μM)を添加した Hb 溶液(5 g/dL, ([heme] = 3.1 mM, PBS (pH 7.4))、あるいは L-Tyr を含有するジペプチド(Tyr-Tyr, Tyr-Glu(100, 250 μM))を添加した 5 g/dL Hb 溶液([heme] = 3.1 mM, PBS (pH 7.4)) を 37°C、大気下にて振とうし経時的にサンプルを採取後、シアノメト Hb 法により met 化率を算出した。

3. L-Tyr 内包 Hb 小胞体の自動酸化抑制効果

L-Tyr (0, 50, 100, 250, 500 μM)を内包した Hb 小胞体(P_{50} : 30 Torr)を調製した。この 5 g/dL Hb 小胞体分散液([heme] = 3.1 mM, PBS(pH 7.4))を酸素分圧 40 Torr、37 °C にて振とうし、経時的に分散液を採取し、UV-vis スペクトルにおける 405

nm (metHb)、430 nm (deoxyHb)の吸光度比から小胞体内 Hb の met 化率を算出した。

4. L-Tyr 内包 Hb 小胞体の保存試験と安定性

10 g/dL Hb 小胞体 ([L-Tyr] = 0, 1.0 mM 内包)分散液を、oxy 体、4°Cにて無菌状態のまま 3 ヶ月間し、met 化率を測定した。また、4°Cにて 24 時間保存後、あるいは 37°Cにて 24 時間自動酸化させた Hb 小胞体分散液をフィルター付き遠心チューブ(cut off : 5 kDa)にて Hb 小胞体と分散媒を分離し、分散媒の蛍光スペクトル(λ_{ex} = 275 nm、 λ_{em} = 303 nm)を測定した。

C. 結果及び考察

1. L-, D-Tyr による Hb 溶液の自動酸化抑制

Hb 溶液に L-Tyr を添加することで、Hb 濃度(775 μM)に対する L-Tyr 添加濃度の増加に伴う自動酸化の抑制が確認された(Fig. 6)。 $T_{1/2}$ は 50 %の oxyHb が metHb となる時間とし、これが L-Tyr 無添加系では約 18.5 hr であったのに対し、250 μM 添加系([L-Tyr]/[Hb]=32 mol%)では約 28.5 hr となり、 $T_{1/2}$ が約 1.5 倍延長した。しかし、D-Tyr 添加系では効果は確認されなかった。

2. L-Tyr 含有ジペプチド及びカタラーゼ添加効果

Fig. 7 に示すように、コントロールよりも L-Tyr 添加系の方が $T_{1/2}$ は 8 hr 延長され、カタラーゼ添

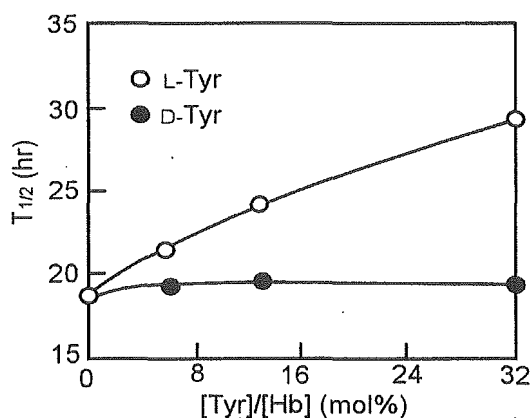


Fig. 6 Suppression of Hb autoxidation by L- or D-Tyr under the O_2 partial pressure of 40 Torr at 37°C.

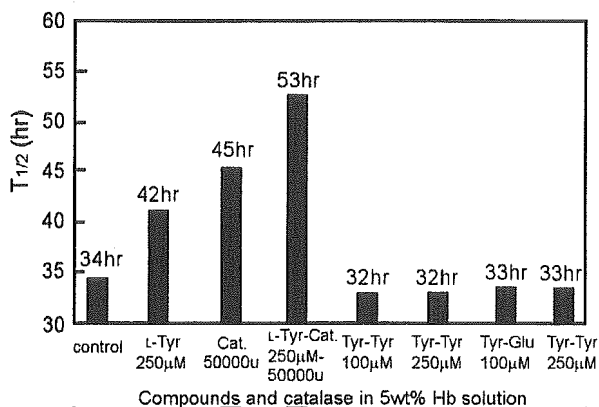


Fig. 7 Suppression of Hb autoxidation by L- or D-Tyr, catalase and L-Tyr-related dipeptides under aerobic condition at 37 °C.

加系では $T_{1/2}$ は 11 hr 延長された。更に、カタラーゼと L-Tyr の共添加系ではコントロールよりも 19 hr 延長され、L-Tyr 添加系とカタラーゼ添加系の相加効果が確認された。この結果より、L-Tyr による Hb の自動酸化抑制はカタラーゼとは異なる機構であることが示された。また、L-Tyr-L-Tyr 及び L-Tyr-L-Glu による Hb の自動酸化抑制は認められなかった。

3. L-Tyr 内包 Hb 小胞体の自動酸化抑制効果

L-Tyr を内包した Hb 小胞体では、小胞体内 Hb 濃度(6.2 mM)に対する L-Tyr 濃度の増加に伴う自動酸化抑制が確認された。L-Tyr 未内包 Hb 小胞体の $T_{1/2}$ は約 12.5 hr であるのに対し、500 µM 内包系(8 mol%)では 18.5 hr となり、 $T_{1/2}$ が約 1.5 倍延長した(Fig. 8)。

さらに L-Tyr 内包濃度を 1 mM(16 mol%)まで増加させたが、 $T_{1/2}$ の値は 500 µM 内包系と同等の値であった。この結果より、L-Tyr の Hb 小胞体への内包濃度は 500 µM が最適であった。また、500 µM L-Tyr 内包 Hb 小胞体を 40 mL/kg で投与しても、投与される L-Tyr 濃度は LD₅₀ の 1/1000 以下であり、安全性に関する問題はないと考えられる。

4. L-Tyr 内包 Hb 小胞体の保存試験と安定性

10 wt%Hb 小胞体([L-Tyr]=0, 1 mM)を oxy 体の

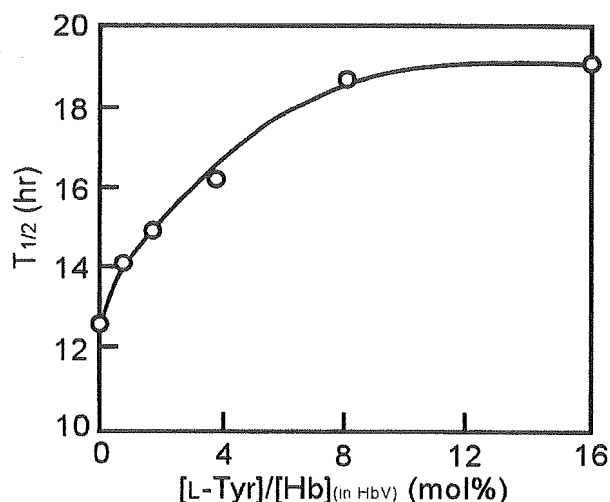


Fig. 8 Suppression of Hb autoxidation within Hb vesicles by co-encapsulated L-Tyr under the O₂ partial pressure of 40 Torr at 37°C.

まま 4°Cにて 3 ヶ月間保存したサンプルのメト化率は、調製直後の初期メト化率が共に 3.0%であったのに対し、L-Tyr 内包 Hb 小胞体は 10.2%、未内包 Hb 小胞体は 24.3%であった。更に、保存時における Hb 小胞体からの L-Tyr の漏出は蛍光スペクトル測定において確認されなかったことから、L-Tyr 内包 Hb 小胞体の化学的安定性は高いことが示された。

D. 結論

L-Tyr は Hb の自動酸化を抑制する効果があることが確認され、D-Tyr あるいは L-Tyr を有するジペプチドでは効果はないことが明らかとなった。更に、L-Tyr を Hb 小胞体へ内包してもその安定効果が確認された。

4. 微小血管モデル内を流動するヘモグロビン小胞体の酸素放出挙動の解析

A. 研究目的

Hb 小胞体が酸素透過性を有する微小血モデル(内径約 28µm)を流動するときの酸素放出挙動を分光学的に数値解析し、赤血球および Hb 溶液と比較

することによりその特徴を明らかにすることを目的とした。本研究は、前田信治教授（愛媛大学医学部生理第二教室）との共同により行った。

B. 研究方法

Ethylene propylene co-polymer 製チューブ（平河ヒューテック社, 内径 28.1, 28.6 μm , 壁厚 37.5 μm ）チューブを観察ホルダに設置し、試料混合液を灌流し酸素飽和度を測定した。チューブは酸素吸収剤として亜ニチオン酸ナトリウム溶液 (20mM) に浸して密閉した。酸素飽和度測定には USP-410 分光器を用いた (測定波長: 500 – 600 nm, 0.2 nm 間隔)。赤血球流速度測定は 2 点光電法を用いた。観察部位は、酸素吸収剤チェンバー内に入ってから距離 1.5, 3, 5, 8, 10 cm とした。流速は 1mm/s になるよう灌流圧 (リザーバー空気圧) を調節した。

酸素飽和度の測定は、管内赤血球流動により吸光度のばらつきが大きいこと、また Hb 小胞体の光散乱により短波長側で吸光度が大きくなることが問題となったので、各条件にて測定を 10 回程度行って積算、更に各波長前後 5 点 (例えば 500 nm を中心に 499.6, 499.8, 500, 500.2, 500.4) の値の平均からスペクトルを得た。赤血球の oxy 型と deoxy 型のスペクトルをもとに、等吸収点 (522, 586) を直線で結びベースラインとし、555 nm と 576 nm の吸光度から検量線を作成した。Hb 小胞体は光散乱

の影響が大きく、赤血球用の酸素飽和度測定プログラムでは酸素飽和度が正確に得られないことが判明した。しかし定常的な透過光が得られるため、吸光度のばらつきは赤血球に比較して小さい。

(測定試料)

RBC: suspended in 5 g/dl HSA, [Hb] = 10 g/dl,

Hct = 29 · 33.3%, P_{50} = 28 Torr

HbV_{HSA}: suspended in 5 g/dl HSA, [Hb] = 10 g/dl,

P_{50} = 28 Torr

HbV_{HES}: suspended in HES, Mw. 40kDa

(Kyorin), [Hb] = 10g/dl, P_{50} = 28 Torr

Hb₂₉: Hb/PLP = 1/3 by mol, [Hb] = 10 g/dL,

P_{50} = 29 Torr

Hb₁₅: Hb/PLP = 1/1 by mol, [Hb] = 10 g/dL,

P_{50} = 15 Torr

赤血球との混合比は、Hb/RBC (vol/vol) = 0/100, 10/90, 50/50, 90/10, 100/0 とした。

C. 結果および考察

1. 細管内流動の状態

Hb 小胞体の混合比が大きくなるに従い、血漿相が増大し赤血球が管の中心側を流れるようになる (Fig. 9)。また Hb 小胞体は粒子の形状は解らないが、粒子が血漿相に均一分散して流れている様子が解った。

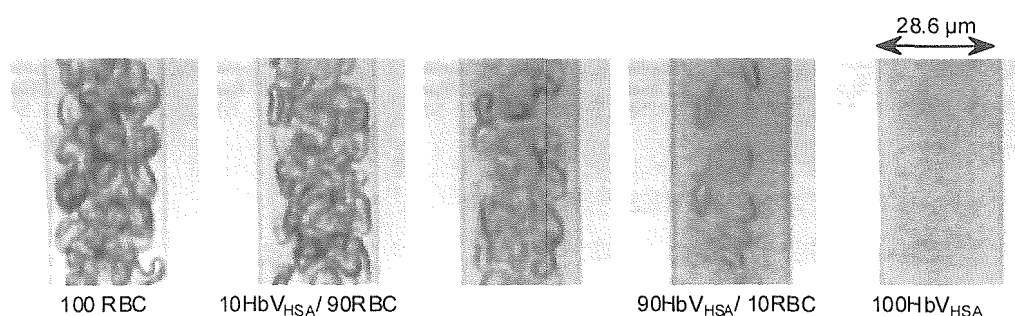


Fig. 9. Flow patterns of HbV_{HSA}/RBC mixtures in a narrow tube. HbV particles were homogeneously dispersed in a suspension medium. They tended to distribute in the marginal zone of the flow. The thickness of the RBC-free layer increased with the increasing amount of HbV_{HSA}. The RBC-free phase becomes darker and more semitransparent, indicating the presence of HbV. Diameter of the tube = 28 μm ; [Hb] = 10 g/dL; centerline flow velocity = 1 mm/s.

2. 細管流動の灌流圧

各混合比で流速を 1 mm/s に設定するために灌流圧を調節したところ、HbV/HSA の混合比が増大するに従い、直線的に灌流圧が増大した (Fig. 10)。これは Hb 小胞体の場合は粘度が 3-4 cP の溶液が均一分散しているが、赤血球が流動する場合は、管の内壁近傍には粘度が 1 cP 程度の血漿層のみが存在し、潤滑剤となっているためとも考えられる。また、血漿増量剤を HES にすると、更に灌流圧が増大した。粘度の低い Hb 溶液を混合した場合の灌流圧は逆に低下した。

3. 酸素放出挙動

酸素飽和度の推移を測定したところ、赤血球では直線的に減少し 10cm 流れたところで飽和度は約 60%に低下した (Fig. 11)。一方、Hb 小胞体の場合も同等であり、血液と混合した場合も混合率に関係なく著しい変化は見られなかった。ストップフロー法で酸素放出速度を測定したときは、希薄溶液の測定であり血液と比較して約一桁大きい速度を示したが (Sakai et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1999;276:H553-H562)、今回 10g/dL の高濃度系での酸素放出を試みたところ、血液と同等の酸素放出挙動を示した。一般的に、小動脈または細動脈内で酸素供給が過剰となると血管収縮が生起することが知られており、修飾 Hb 溶液系の投与で認められる血管収縮を、酸素放出の促進作用に起因しているとする説がある。Hb 小胞体の場合は血管収縮を生起しないが、これが酸素放出速度が赤血球と同等である事実からも説明できる。

Hb 小胞体の外水相の血漿増量剤を HES と HSA で比較した場合、HbV/HES 系の粘度が高いため (8 cP 程度、HbV/HSA は 3-4cP 程度)、灌流圧の大きな違いとなって現れた。しかし一定流速の条件では両者に酸素放出速度の相違は無かった (Fig. 12)。一定流速とすることで粘度の効果が低下したものと考えられる。

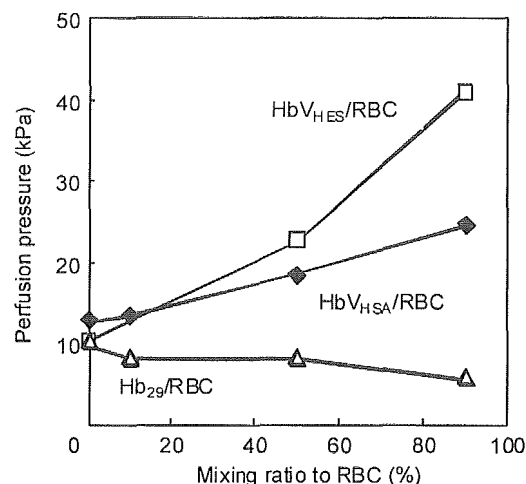


Fig. 10. Perfusion pressure of the HbV_{HSA}/RBC, HbV_{HES}/RBC and Hb₂₉/RBC mixtures ([Hb] = 10 g/dL) flowing in the narrow tube with the centerline flow velocity of 1 mm/s.

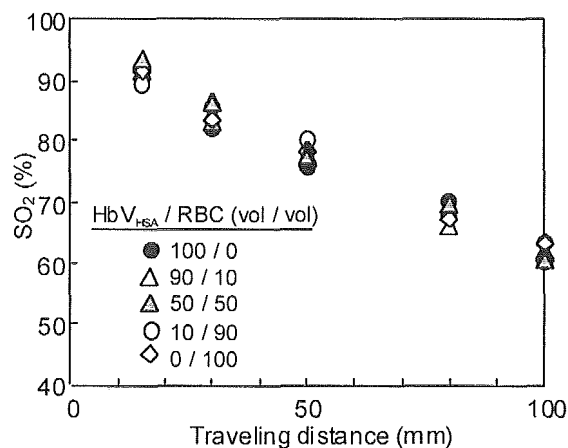


Fig. 11. O₂-release from the HbV_{HSA}/RBC mixture for various mixing ratios determined at various traveling distances.

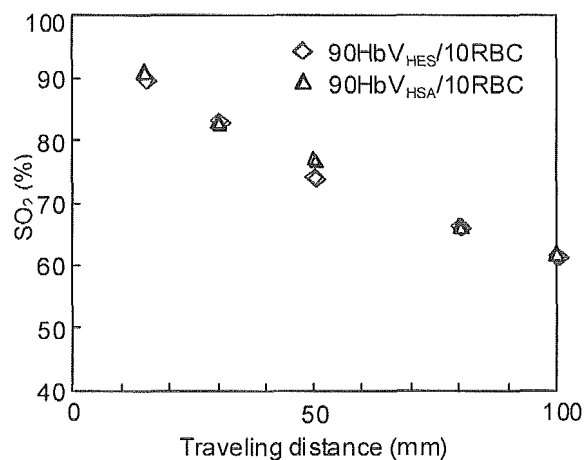


Fig. 12. Effect of suspending media on the O₂-release from HbV/RBC mixture; comparison of 90HbV_{HSA}/10RBC and 90HbV_{HES}/10RBC determined at various traveling distances.

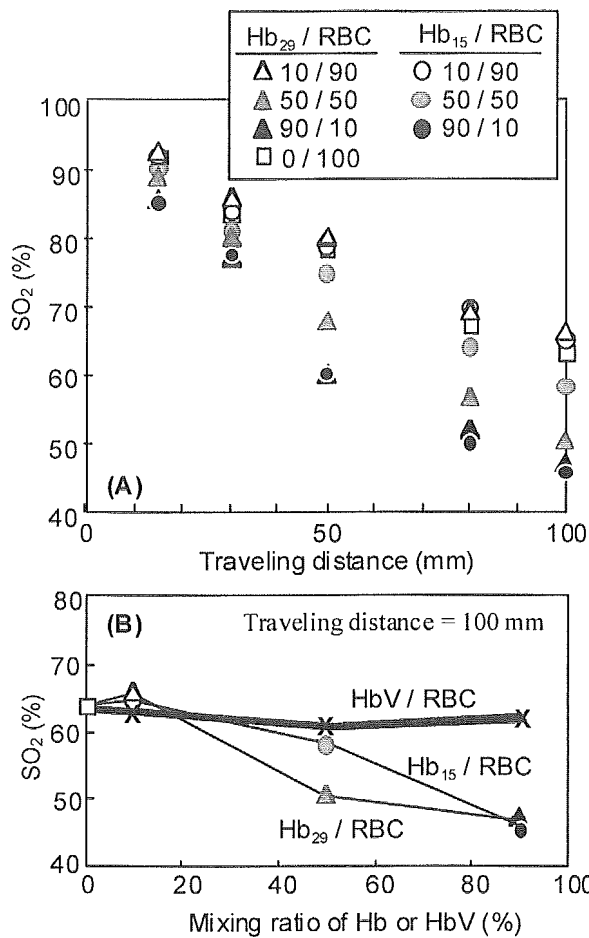


Fig. 13. (A) Effect of oxygen affinity on the O₂-release from the Hb/RBC mixtures at various traveling distances: comparison of Hb₂₉/RBC and Hb₁₅/RBC of various mixing ratios. (B) Effect of the mixing ratio, Hb/RBC and HbV/RBC, on the O₂ saturation: data from (A) for Hb/RBC and from Fig. 5 for HbV/RBC at the traveling distance of 100 mm.

Hb 溶液を赤血球に 10vol%混合しても酸素放出速度には違いは殆ど見られなかったが (Fig. 13)、50vol%添加すると Hb₂₉ (Hb/PLP=1/3)の場合に特に顕著に放出速度が速くなった。90vol%添加すると PLP の量に依らず、酸素放出速度は著しく速くなり、10cm 流れたところで酸素飽和度は 46%に到達した。Hb 溶液では HbO₂ 自体の拡散により、酸素の促進輸送効果を示したものと考えられる。他方、Hb 小胞体の酸素放出速度は、赤血球と同等であった。Hb 小胞体の粒子が大きいため促進輸送の効果は無かったと考えられる。

D. 結論

Hb 小胞体の酸素放出速度はモデル血管内(内径 25 μ m)では赤血球と同等であり、混合比にも依存しなかった。しかし、Hb 溶液は、赤血球との混合比に応じて酸素放出速度が増大した。Hb 溶液では HbO₂ 自体の拡散により、酸素の促進輸送効果を示したものと考えられる。他方、Hb 小胞体の酸素放出速度は、赤血球と同等であった。

4. ヘモグロビン小胞体の投与による有茎皮弁虚血領域の酸素化

A. 研究目的

脳硬塞や心筋梗塞など、血管障害により血流量が低下し低酸素状態に陥った組織細胞を壊死させないためには、酸素供給を回復させることが先ず必要である。虚血領域への酸素供給は側副経路からの血流に依存せざるを得ないが、血流中に赤血球とは物性の異なる人工赤血球が存在すれば、酸素供給の向上が期待できる。ここでは、側副経路を有する虚血性低酸素状態にある有茎皮弁モデルをハムスターで作成し、Hb 小胞体分散液で血液希釈することにより、酸素化の改善を試みたので、その結果を報告する。本研究は、早稲田大学と Dr. Dominique Erni (Inselspital University Hospital, Bern Univ., Switzerland)の共同で実施された。

B. 研究方法

Syrinan Golden Hamster (65 – 85g, ♂)をネンブタール腹腔内投与(100 mg/kg)により麻酔し、頸動静脈に挿管。背部皮膚に小動脈と小静脈の対で繋がった有茎皮弁を作成した(Fig. 14)。この小動静脈対は皮弁内で二方向に分岐するが、このうち片方を完全結紮し血流を遮断した。従って遮断した側の組織には、側副経路を経由した血流のみが到達することになる。結紮しない側の血流のある側を(Anatomically perfused tissue, 血流存在組織)、

結紮した側を(Ischimic Part, 虚血組織)とした。

顕微鏡下、有茎皮弁内の微小血管内血流像を観測した。血管径はモニター上で計測した。血管内中央の血流速度は、Rhodamine G ラベルした白血球の流動を追尾して測定した。組織酸素分圧は、クラーク型酸素電極(Revoxode CC1, GMS; Keil, Germany)により測定した。血流存在組織の小動脈内の血流速度は7-8 mm/secであったが、虚血組織の血流速度は0.4-0.8 mm/secにまで低下していた。

酸素親和度の異なる二種類の Hb 小胞体を調製した($P_{50} = 15, 30$ Torr)。これを6%デキストラン溶液(Dx70, B. Braun Medical, Emmenbrucke, Switzerland)に分散させ、Hb濃度を7.5 g/dLとした。膠質浸透圧は50 Torr, 粘度は8.7 cPであった。Dx70 単独での膠質浸透圧は50 Torr, 粘度は2.8 cPであった。

ハムスターはネブタールを継続投与(0.5 mg/min/kg)して実験中の麻酔を維持した。10分かけて頸動脈からの脱血と頸静脈からの投与を同時に行った。Dx70 (n=10), HbV15-Dx70 (n=9), HbV30-Dx70 (n=9)を投与し、血液交換率が15%, 30%, 50%に到達した時点で測定を行った。間隔は1時間とした。

C. 結果および考察

全身動態については、血圧は全群有意な変化なかった。Dx70 群では血液希釈率が高くなるに連れ酸素供給量が低下するので、動脈血酸素分圧の有意な上昇と二酸化炭素分圧の有意な低下が認められたが、他は安定していた。皮弁内の血管径の変動は殆ど無かった。血流速度の変化を Fig. 15 に示した。血流存在組織では血流に殆ど変化は無かったが、虚血組織では血流の増大が見られた。特に血液交換率が30%, 50%のとき、Dx70 群で144%, HbV15-Dx70 群で166%, HbV30-Dx70 群で141%への上昇が見られた。これはDx70の粘度2.8cPは血漿の粘度(1 cP程度)よりも高いため、上流側で血

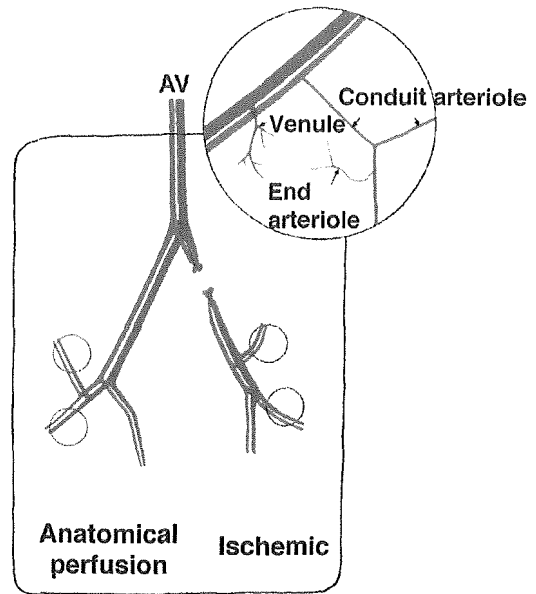


Fig. 14. Schematic representation of the hamster dorsal skin flap model. One branch of the small artery was ligated to prepare ischemic part.

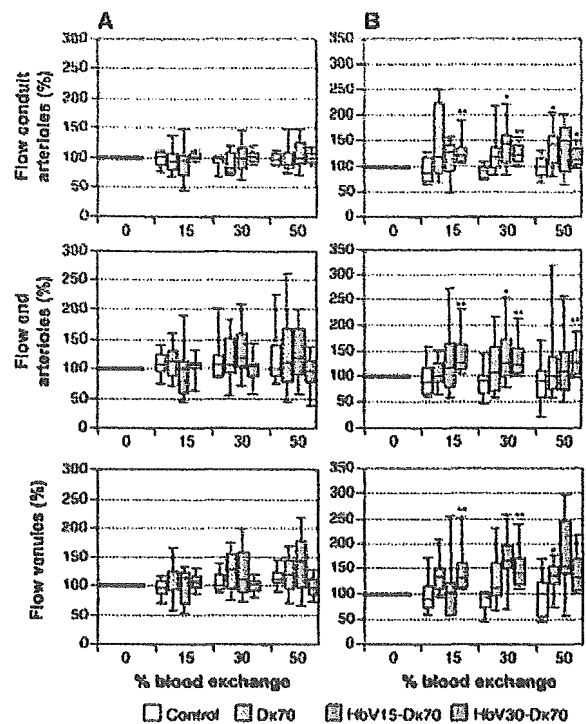


Fig. 15. Microvascular blood flow in the anatomically perfused (A) and ischemic (B) tissues at baseline and after stepwise exchange of 15%, 30%, and 50% total blood volume with 6% Dx70, HbV15-Dx70, and HbV30-Dx70. Data are given as a percentage of baseline and are presented in box plots reflecting 10th percentile, 25th percentile, median, 75th percentile, and 90th percentile. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. baseline.

管壁で高い張り応力を生起し、これが血管拡張を引起こして血流を増加させたこと、或いは粘度増大により末梢血管により均一に血流が分布されるためと考えられる。

血液希釈前の組織酸素分圧は、血流存在組織では 23–27 Torr に対し、虚血組織では 7–11 Torr にまで低下していた。血液希釈後、血流存在組織の酸素分圧には殆ど変化は見られなかったが (Fig. 16)、虚血組織では、血液交換率が高くなるにつれて上昇し、HbV15-Dex70 群で 217±67%にまで、HbV30-Dex70 群では 164±33%にまで上昇した。血流の増大に加え、Hb 小胞体の存在による酸素運搬量の増大が組織酸素分圧を増大させた主要因と考えられる。また、酸素を放し難い HbV15 の方が HbV30 に比べてより末梢側で酸素を放出する作用が強いことも要因として考えらえられた。

D. 結論

酸素親和度の高い(P₅₀ の低い)Hb 小胞体の方が高い組織酸素分圧を示したことから、虚血領域のように既に酸素分圧が低下している部位に酸素を供給するには、酸素親和度を高くして血流の上流での損失を無くして虚血部位に到達してから酸素を放出することが有効であると考えられる。

今回の結果は、Hb 小胞体の投与が虚血性疾患に有効であることを示した最初の例であり、同様の機序により心筋梗塞や脳梗塞モデルでもその有効性が明らかになるものと期待される。

研究業績

1. 論文発表

1. K. Kobayashi, T. Komatsu, A. Iwamaru, Y. Matsukawa, M. Watanabe, H. Horinouchi, E. Tsuchida. Oxygenation of hypoxia region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic Hemes. *J. Biomed. Mater. Res.* **64A**, 48–51 (2003).

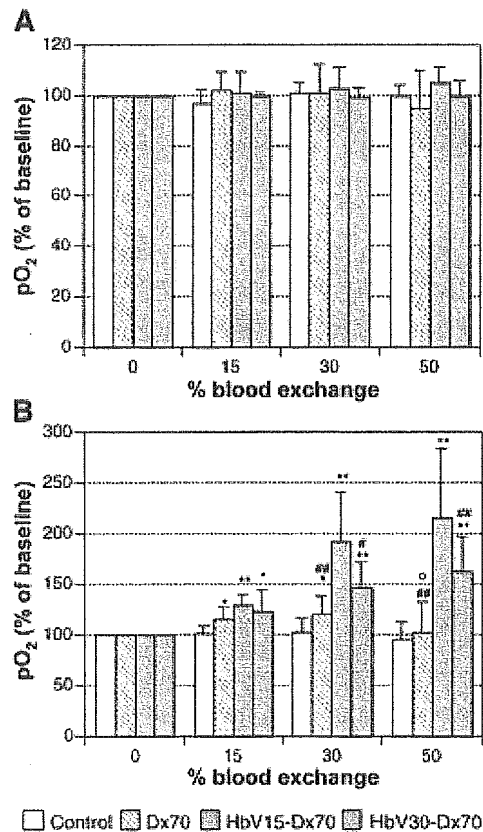


Fig. 16. PO₂ in the anatomically perfused (A) and ischemic (B) tissues at baseline and after stepwise exchange of 15%, 30%, and 50% total blood volume with 6% Dx70, HbV15-Dx70, and HbV30-Dx70. Data are given as a percentage of baseline and represent means ± SD. *P < 0.05 and **P < 0.01 vs. baseline; #P < 0.05 and ## P < 0.01 vs. HbV15-Dx70; °P < 0.01 vs. HbV30-Dx70.

- E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Matsukawa, A. Nakagawa, H. Sakai, K. Kobayashi, M. Suematsu. Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J. Biomed. Mater. Res.* **64A**, 257–261 (2003).
- Y. Huang, T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida, S. Kobayashi. Compatibility *in vitro* of albumin-heme (O₂-carrier) with blood cell components", *J. Biomed. Mater. Res.* **66A**, 292–297 (2003).
- A. Nakagawa, T. Komatsu, N. Ohmichi, E. Tsuchida. Synthetic dioxygen-carrying hemoprotein: human serum albumin including iron(II) complex of protoporphyrin IX with an axially coordinated histidylglycyl-propionate. *Chem. Lett.* **32**, 504–505

- (2003).
5. T. Komatsu, M. Moritake, E. Tsuchida. Molecular energy and electron transfer assemblies made of self-organized lipid-porphyrin bilayer vesicles". *Chem. Eur. J.* **9**, 4626–4633 (2003).
 6. P. A. Zuszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, S. Curry. Crystal structural analysis of human serum albumin complexes with heme and fatty acid", *BMC Structural Biology* **3**, 6 (2003).
 7. E. Tsuchida, A. Nakagawa, T. Komatsu. Coordination structure of active site in synthetic hemoprotein (albumin-heme) with dioxygen and carbon monoxide. *Macromol. Symp.* **195**, 275–280 (2003)
 8. Y. Huang, T. Komatsu, E. Tsuchida. Microcalorimetry investigation of syntehtic hemoprotein (albumin-heme). *Polym. Adv. Technol.* **14**, 729-732 (2003).
 9. 小松晃之, 石原星児, 土田英俊. テトラ (シクロヘキサノイル) 基を有するヘムを包接させたアルブミン-ヘム複合体の酸素結合反応. *人工血液* **11**, 167–172 (2003).
 10. E. Tsuchida, T. Komatsu. Oxygen-carrying plasma hemoprotein Albumin-heme: Nitric oxide binding and physiological responses after administration in vivo. *Macomol. Symp.* **204**, 13–18 (2003).
 11. C. Contaldo, S. Schramm, R. Wettstein, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leunig, A. Banic, D. Erni. Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O₂ affinity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H1140-H1147 (2003).
 12. H. Sakai, Y. Suzuki, M. Kinoshita, S. Takeoka, N. Maeda, E. Tsuchida. O₂-Release from Hb-Vesicles Evaluated Using an Artificial Narrow O₂-Permeable Tube: Comparison with RBC and Acellular Hb.. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H2543-H2551 (2003).
 13. Y. Teramura, H. Kanazawa, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida. The prolonged oxygen –carrying ability of Hb vesicles by coencapsulation of catalase in vivo. *Bioconjugate Chem.* **14**, 1171-1176 (2003).
 14. Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol Prog.*, **19(5)**, 1547-52 (2003).
 15. 久本秀治、酒井宏水、福富一平、宗慶太郎、武岡真司、土田英俊. 酸素輸液ヘモグロビン小胞体に混在するリポポリサッカライドの定量法. *人工血液* **11**, 173-178 (2003).
 16. H. Sakai, S. Hisamoto, I. Fukutomi, K. Sou, S. Takeoka, and E. Tsuchida. Detection of Lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by *Limulus* amoebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gell clotting analysis and pretreatment with a surfactant. *J. Pharm. Sci.* **93**, 310-321 (2004).
 17. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit. Care Med.* **32**, 539-545 (2004).
 18. H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, M. Takaori, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model." *Biomaterials* **25**, (2004) (in press, Oct. 27th, 2003).
- (総説、著書など)
19. 土田英俊、宗慶太郎、酒井宏水、小松晃之、武岡真司、堀之内宏久、末松誠、小林紘一. 酸素輸液(人工赤血球)の安全度と体組織への酸素供給” *麻酔* **53**(増刊号) S55-S66 (2003)
 20. 土田英俊、酒井宏水、武岡真司、宗慶太郎、小林紘一. 酸素輸液(人工赤血球)” *医学のあゆみ* **205**, 558-566 (2003)
 21. 土田英俊. 臨床応用可能な酸素輸液(人工赤血球)の創製に関する研究. *人工臓器* **32**, 29-36 (2003).
 22. 酒井宏水. 土田英俊、海外文献紹介"赤血球代替物を用いる蘇生法による外傷後過剰炎症反応の変化." *人工血液* (2004) (in press).

23. 土田英俊. 酸素輸液の安全性と人工赤血球としての効果. *TMDM MATE* **233**, 4-5 (2004).
24. 土田英俊、武岡真司、小松晃之、酒井宏水、”人工赤血球”「新訂版・表面科学の基礎と応用」第12節、エヌ・ティー・エス社 (2004)(印刷中)
25. K. Kobayashi, H. Horinouchi, M. Watanabe, Y. Izumi, Y. Teramura, A. Nakagawa, Y. Huang, K. Sou, H. Sakai, T. Komatsu, S. Takeoka, E. Tsuchida. Safety and efficacy of hemoglobin-vesicles and albumin-hemes. In: *Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol. 12*, Springer-Verlag (Tokyo, 2004).(印刷中)

2. 学会発表

1. 中川晶人、小松晃之、土田英俊／近位塩基を有するプロトヘム誘導体の合成とそのアルブミン包接体の酸素結合反応／第52回高分子学会年次大会／2003.5.／名古屋
2. 小松晃之、土田英俊／酸素輸送合成ヘム蛋白質“アルブミン-ヘム”の構築と生体への応用 (依頼講演)／第52回高分子討論会／2003.9.／山口
3. 石原星児、小松晃之、西出宏之、土田英俊／テトラシクロヘキサノイル置換ポルフィリン鉄を包接したアルブミン複合体の酸素結合反応／第52回高分子討論会／2003.9.／山口
4. 小黒由希子、小松晃之、武岡真司、土田英俊／アルブミン二量体の特徴とヘム複合体の酸素結合反応／第41回日本人工臓器学会／2003.10.／仙台
5. 中川晶人、小松晃之、大道直美、土田英俊／ジアセチルデューテロヘム誘導体を活性中心とするアルブミン-ヘム複合体の酸素結合反応／第41回日本人工臓器学会／2003.10.／仙台
6. 黄宇彬、小松晃之、山本尚志、武岡真司、土田英俊、堀之内宏久、小林紘一、甲斐俊哉、弘津一郎／ラット脱血ショックモデルを用いたアルブミン-ヘムの酸素運搬能評価／第41回日本人工臓器学会／2003.10.／仙台
7. 小松晃之、土田英俊／(招待講演) 人工酸素運搬体“アルブミン-ヘム”の特徴と酸素輸送能／第18回日本薬物動態学会年会／2003.10.／札幌
8. 小松晃之、土田英俊／(教育講演) 酸素輸送合成ヘム蛋白質“アルブミン-ヘム”の創製と酸素輸液の展開／第19回体液・代謝管理委員会／2003.1.／東京
9. 土田英俊 / (招待講演) 酸素輸液 (人工赤血球) 開発の現状と近未来の展開／日本麻酔科学会／2003.6.31／パシフィコ横浜
10. 堀之内 宏久、泉陽太郎、渡辺真純、武岡真司、小松晃之、酒井宏水、土田英俊、小林紘一／臨床応用を目指した人工酸素運搬体の開発研究：現状と展望／第8回日本心臓血管麻酔学会 学術大会・総会／2003.9.27-28／奈良県新公会堂
11. 久本修治、酒井宏水、武岡真司、土田英俊／界面活性剤を用いたヘモグロビン小胞体のリポポリサッカライド定量法／第41回日本人工臓器学会大会／2003.10.30-11.1／仙台市民会館
12. 酒井宏水、武岡真司、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊／人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) の反復投与による安全度評価／第41回日本人工臓器学会大会／2003.10.30-11.1／仙台市民会館
13. 久保田 恒平・寺村 裕治・武岡 真司・西出 宏之・土田 英俊／ヘモグロビン小胞体のメト化抑制および in vivo 評価／日本化学会第84春季年会／2004.3.27 / 神戸
14. T. Komatsu, E. Tsuchida / Molecular energy and electron transfer assemblies made of self-organized lipid-porphyrins / IUPAC 10th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes / 19-23 May 2003./ Moscow (Russia)
15. E. Tsuchida / Safety and efficacy of hemoglobin-vesicles and albumin-hemes / IUPAC 10th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes (Plenary Lecture) / 19-23 May 2003./ Moscow (Russia)
16. Y. Huang, T. Komatsu, E. Tsuchida / Physiological response and oxygen delivery of albumin-heme in exchange transfusion into rats / IUPAC 10th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes / 19-23 May 2003./ Moscow (Russia)
17. A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida / Human serum albumin hybrids including iron complex of

protoporphyrin IX derivative with a proximal base and their dioxygenation. / IUPAC 10th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes / 19–23 May 2003./ Moscow (Russia)

18. E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicles and albumin-hemes based on Nano-molecula Sciences / ASAIO-ISAIO Joint Conference (Workshop: Blood substitutes, Present and Future) / 2003.6.18
19. E. Tsuchida / Oxygen infusions (hemoglobin-vesicles and albumin-hemes) based on nano-molecular sciences (Plenary Lecture) 7th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 21–24 Sept. 2003 / Fort Landerdale (USA)
20. T. Komatsu, E. Tsuchida, / Energy and electron Transfer Assemblies Made of Self-organized Lipid-porphyrins in Water", 7th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 21–24 Sept. 2003 / Fort Landerdale (USA)
21. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physicochemical properties of Hb-vesicles (HbV) and their O₂ transporting efficiency in vivo. / 7th International Symposium on Polymers for Advanced

Technologies / 2003.9.21-24 / Fort Lauderdale, Florida

22. K. Sou, S. Takeoka, E. Tsuchida / Synthesis and molecular assembly of aminolipids to form stable hemoglobin-vesicles (HbV). / 7th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 2003.9.21-24 / Fort Lauderdale, Florida
23. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Rheological properties of PEG-modified Hb-vesicles (HbVs) and their oxygen-transporting capacity in vivo. / The Spring 2004 ACS National Meeting / March 28-April 1, 2004 / Anaheim, CA, USA.

(新聞報道)

読売新聞朝刊「感染不安ない人工血液：早・慶大など開発、2年後の実用化目指す」(H16.1.25)

毎日新聞朝刊「感染血液すり抜けなぜ？：-研究進む人工血液-まずは赤血球 実用化の期待」(H16.3.13)

日本経済新聞朝刊「人工赤血球を量産：ニプロなど、安定供給に道」(H16.3.19)

分担研究報告書

救急災害医療に使用可能な人工赤血球の開発に関する研究

分担課題：出血性ショックにおける人工赤血球が酸素消費に及ぼす影響

- 中動物を用いた検討 -

分担研究者 堀之内宏久 慶應義塾大学医学部 外科 講師

研究協力者 山本 学 慶應義塾大学医学部 外科 助手

藤本博行 慶應義塾大学医学部 外科 助手

研究要旨

中型動物において出血性ショックを想定した動物モデルを作成するため、条件を変えたモデルを作成、酸素運搬能について検討した。6 ヶ月齢のビーグル犬を用い種々の条件を変えてショックモデルを作成して検討した。出血性ショック時の人工赤血球の酸素運搬能を評価するためには脾摘を行った後、交換輸血の手技を用いて循環血液量の 70% を 5% アルブミン生食に置換後、30% の脱血を行い、出血性ショックとし、30 分のショック状態の維持を行ない、蘇生を行うモデルがふさわしいと考えられた。このモデルでは、ショック状態を維持した後、5% アルブミン生食で蘇生を行っても血圧は低値で推移し、酸素消費量も減少した。

A. 研究目的

人工赤血球の性質、効果、安全性については現在まで少量ずつを調製していたため、小動物を用いた研究が主体であったが、製造技術の進歩により、中、大動物による臨床応用に即した研究を行うことが可能となった。救急災害医療における輸血の代替として出血性ショックの治療に用いた場合の酸素代謝について検討することを目的とした。

B. 研究方法

ビーグル犬(約 7kg)を用い、ケタミンによる静脈麻酔後に気管内挿管を行ない、セボフルレンによって麻酔を維持した。呼吸器は酸素濃度 33% で、15ml/kg の一回換気量、15 回/分換気を行なった。四肢に心電図記録用の電極を装着、大腿動脈に動脈ライン(血圧のモニター及び脱血ライン)、大腿静脈より混合静脈血酸素飽和度連続測定の可能な Swan-Ganz カテーテル(5Fr, Baxter Medical)を肺

動脈内に挿入留置し、血圧、脈拍、動脈圧、肺動脈圧、混合静脈血酸素飽和度を連続測定し、経時的に心拍出量(熱希釈法)、肺動脈楔入圧、中心静脈圧、動脈血ガス分析、混合静脈血ガス分析を行ない、循環動態、酸素動態を把握することとした。

出血性ショックモデルとして ① 40% 脱血によるショックを作成後に、5% アルブミン生食を用いて蘇生するモデル、② 50% 脱血によるショックを作成後に 5% アルブミン生食による蘇生、③ 脾摘後に 40% 脱血によるショックを作成後に、5% アルブミン生食を用いて蘇生するモデル④ 脾摘後に 50% 脱血によるショックを作成後に、5% アルブミン生食を用いて蘇生するモデル、⑤ 循環血液量の 40% を 5% アルブミン生食にて希釈後に 50% の脱血ショックを作成、その後に 5% アルブミン生食を用いて蘇生するモデル、⑥ 脾摘後に循環血液量の 70% を 5% アルブミン生食にて希釈後に 30% の脱血ショックを作成、その後に 5% アルブミン生食を

用いて蘇生を行なうモデル ⑦ 脾摘後に循環血液量の70%を5%アルブミン生食にて交換後に40%の脱血ショックを作成、その後に5%アルブミン生食を用いて蘇生を行なうモデルを作成し、それぞれの循環動態、酸素運搬、酸素消費量を検討した。

C. 研究結果

40%脱血交換モデル、50%脱血ショックモデル、脾摘後50%脱血ショックモデル、40%血液希釈後50%脱血ショックモデルでは、脱血後に血圧の低下を認めた。

血圧、肺動脈圧等の循環の指標は出血ショック中に低値を推移したが、蘇生液の投与とともに血圧は上昇し、循環動態は安定した。脾摘後50%脱血ショックモデルでは血圧の低下が著しく、心拍数の低下をきたしたが、5%アルブミン生食を用いた蘇生にてショック状態を脱し、安定した循環動態が得られた。脾摘後70%血液希釈、30%脱血ショックのモデルでも蘇生後には安定した循環動態が得られた。脾摘後70%血液希釈、50%脱血ショックモデルではショック維持時間中に血圧の維持が困難となり、心停止をきたす動物があり、また、ショック維持時間後に5%アルブミン生食を用いて蘇生を開始できた動物も循環動態を正常化する

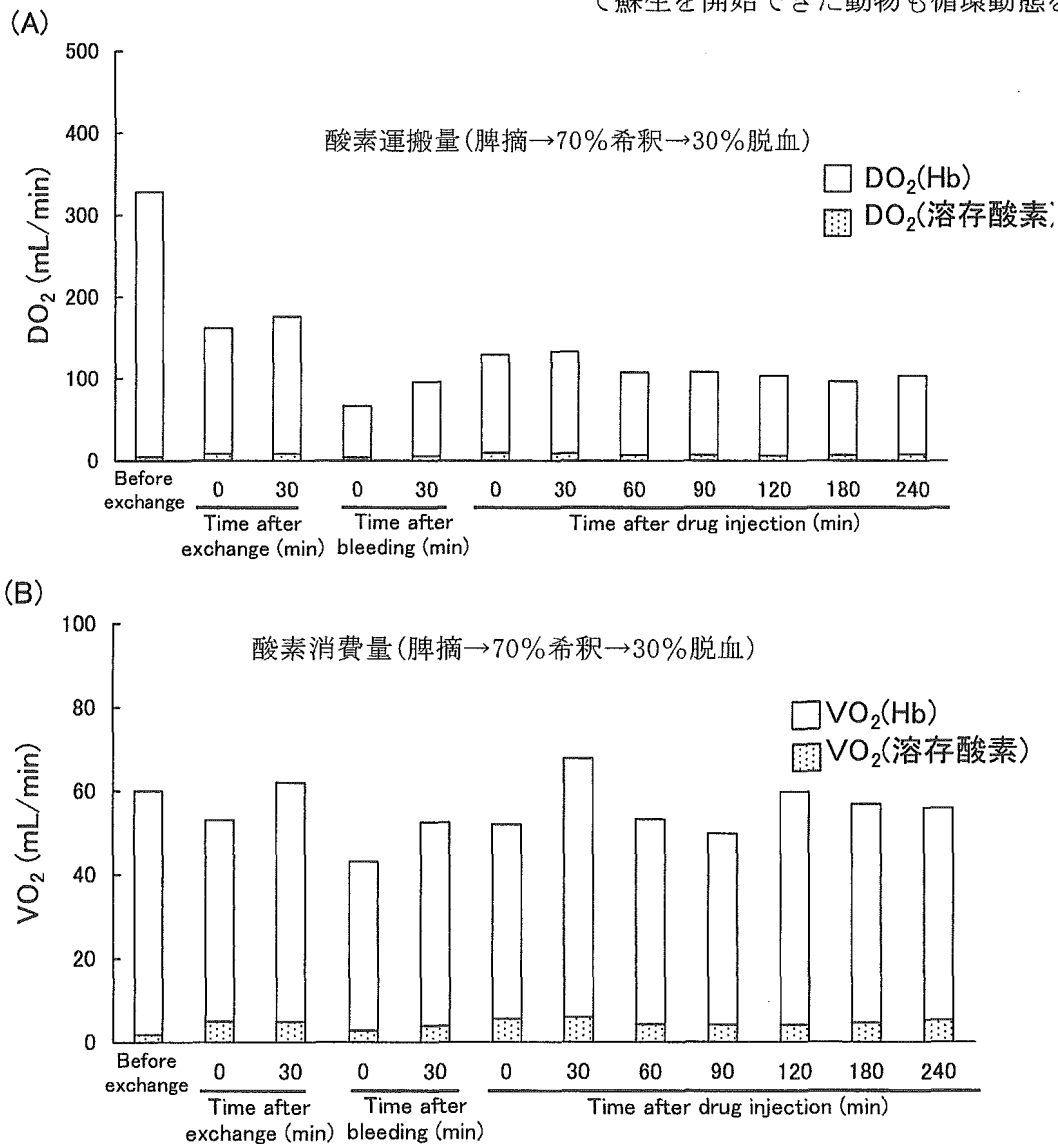


図1 出血性ショックモデル (脾摘→70%希釈→30%脱血) における酸素輸送パラメータの推移。
A: 酸素運搬量、B: 酸素消費量

ことができずに観察時間内に心停止した。

酸素消費量を検討すると、いずれの群でも出血性ショック後の酸素運搬量は血中の Hb 濃度の減少により低下し、酸素消費量も低値を推移した。脾摘、70%希釈、30%出血のグループでは酸素運搬量は脾摘後 240ml/min 程度であったが、出血性ショック導入後は 60~100ml/min に低下し、酸素消費量は脾摘後 55~65ml/min と低下した(図 1)。

D. 考察

出血性ショックの研究では現在まで種々のモデルが開発されており、蘇生液、蘇生法、血管透過性の変化を中心にした研究が主体を占めていた。今回、人工酸素運搬体の出血性ショックに対する効果を検証するに当たり、臨床に即した形での出血性ショックモデルを作成することを主眼とした。モデルとして考えられたのは、出血後 1 時間のショック状態を維持し、その後に蘇生液を用いて蘇生を行うことを基本とし、出血量、ショック維持時間、脾摘の有無を変更して検討を行った。

脾臓は腹腔内にあつて、血液の reservoir として働き、出血時には脾臓が収縮することによって赤血球を補充する体内貯血部位となっているとの考え方があつたため、あらかじめ脾摘を行ったモデルを作成した。出血量については 40%脱血、50%脱血、50%血液希釈後 50%脱血、70%希釈後 50%脱血のモデルを作成した 70%希釈後 50%脱血を行うモデルではショック状態を維持している間に心機能の低下が著しくなり、心停止をきたす動物もあつた。酸素消費量を検討すると、いずれの系でも出血ショック後に酸素運搬は減少する。酸素消費は出血ショックに伴い低下し、血液 pH、Base Excess も低下した。特に脾摘、70%希釈、30%脱血による出血性ショックの設定では、pH、BE は回復することなく酸素消費も低値のままであつた。これは、酸素運搬が抑えられたために臓器での嫌気解糖が進んだためと考えられ、人工赤血球による酸素運搬の効果を評価するためにふさわしい実

験系であると考えられた。

E. 結論

出血性ショックに対する人工赤血球の酸素運搬効果を評価するためにふさわしいモデルとして、脾摘後に循環血液量の 70%をアルブミン生食にて希釈し、30%の脱血を行ってショック状態として 1 時間のショックの維持を行なった後に蘇生を行う実験系が人工血液のショック蘇生の効果を評価するために適当なモデルと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Kobayashi, T. Komatsu, A. Iwamaru, Y. Matsukawa, M. Watanabe, H. Horinouchi, E. Tsuchida. Oxygenation of hypoxia region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic Hemes. *J. Biomed. Mater. Res.* **64A**, 48-51 (2003).
2. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Matsukawa, A. Nakagawa, H. Sakai, K. Kobayashi, M. Suematsu. Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J. Biomed. Mater. Res.* **64A**, 257-261 (2003).
3. Y. Huang, T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida, S. Kobayashi. Compatibility *in vitro* of albumin-heme (O₂-carrier) with blood cell components", *J. Biomed. Mater. Res.* **66A**, 292-297 (2003).
4. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit. Care Med.* **32**, 539-545 (2004).
5. H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, M. Takaori, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model." *Biomaterials* **25**, (2004) (in press).
6. A. Yoshizu, Y. Izumi, S. Park, H. Sakai, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. "Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier Hemoglobin Vesicle (HbV) maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma necrosis factor alpha (TNF α). *ASAIO J.* (submitting).

(総説、著書など)

7. 土田英俊、宗慶太郎、酒井宏水、小松晃之、武岡真司、堀之内宏久、末松誠、小林絃一. 酸素輸液(人工赤血球)の安全度と体組織への酸素輸送” 麻酔 53(増刊号) S55-S66 (2003)
8. 土田英俊、酒井宏水、武岡真司、宗慶太郎、小林絃一. 酸素輸液(人工赤血球)” 医学のあゆみ 205, 558-566 (2003)
9. K. Kobayashi, H. Horinouchi, M. Watanabe, Y. Izumi, Y. Teramura, A. Nakagawa, Y. Huang, K. Sou, H. Sakai, T. Komatsu, S. Takeoka, E. Tsuchida. Safety and efficacy of hemoglobin-vesicles and albumin-hemes. In: *Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine* Vol. 12, Springer-Verlag (Tokyo, 2004).(印刷中)

2. 学会発表

1. 小林絃一 / (会長講演) 青年期を迎える日本呼吸器外科学会 / 第 20 回日本呼吸器外科学会 / 2003.5.8 / 東京
2. 小林絃一 / (会長講演) 人工酸素運搬体の開発 / 第 56 回日本胸部外科学会 / 2003.11.20 / 東京
3. 小林絃一 / (イブニングセミナー) 人工酸素運搬体の臨床応用を目指して / 第 12 回日本形成外科学会基礎学術集会 / 2003.10.9 / 東京
4. 黄 宇彬、小松晃之、山本尚志、武岡真司、土田英俊、堀之内宏久、小林絃一、甲斐俊哉、弘津一郎 / ラット脱血ショックモデルを用いたアルブミン-ヘムの酸素運搬能評価 / 第 41 回日本人工臓器学会 / 2003.10. / 仙台

5. 堀之内 宏久、泉陽太郎、渡辺真純、武岡真司、小松晃之、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / 臨床応用を目指した人工酸素運搬体の開発研究：現状と展望 / 第 8 回 日本心臓血管麻酔学会 学術大会・総会 / 2003. 9. 27-28 / 奈良県新公会堂
6. 酒井宏水、武岡真司、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) の反復投与による安全度評価 / 第 41 回日本人工臓器学会大会 / 2003.10.30 - 11.1 / 仙台市民会館
7. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physicochemical properties of Hb-vesicles (HbV) and their O₂ transporting efficiency in vivo. / 7th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 2003.9.21-24 / Fort Lauderdale, Florida
8. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Rheological properties of PEG-modified Hb-vesicles (HbVs) and their oxygen-transporting capacity in vivo. / The Spring 2004 ACS National Meeting / March 28-April 1, 2004 / Anaheim, CA, USA.

(新聞報道)

読売新聞朝刊「感染不安ない人工血液：早・慶大など開発、2年後の実用化目指す」(H16.1.25)

毎日新聞朝刊「感染血液すり抜けなぜ? : -研究進む人工血液-まずは赤血球 実用化の期待」(H16.3.13)

日本経済新聞朝刊「人工赤血球を量産：ニプロなど、安定供給に道」(H16.3.19)

分担研究報告書

救急災害医療に利用可能な人工赤血球に関する研究

分担課題：ラット局所脳虚血モデル梗塞部位の人工赤血球による酸素化

分担研究者 外 須美夫 北里大学医学部麻酔科学 教授

研究協力者 岡本浩嗣 北里大学医学部麻酔科

肝付 洋 北里大学医学部麻酔科

研究要旨

臓器虚血により生じる梗塞部位への酸素供給液としての酸素輸液（人工赤血球製剤）の将来的応用の可能性を、ラット局所脳虚血モデルを用いて検討した。ラットの局所脳虚血前に人工赤血球製剤及びアルブミン製剤にて血漿交換した際の脳梗塞領域サイズを比較した。脳梗塞領域は人工赤血球製剤にて血漿交換を行った群で有意に小さかった。本研究により、人工赤血球製剤の梗塞部位への酸素供給液としての応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、脳虚血後の脳梗塞領域に及ぼす酸素輸液（＝人工赤血球製剤）の有用性について検討することである。ラット局所脳虚血モデルを用いて脳虚血惹起前に血漿交換を行い、脳梗塞領域サイズに与える影響をアルブミン製剤と人工赤血球製剤で比較検討した。

B. 研究方法

対象は雄性の SD ラット (n=16) (体重：350～400g) とした。基礎麻酔として Urethan 600mg/kg と α -Chloralose 60mg/kg の混合液の腹腔内投与を行い、気管切開後、気管内チューブを挿入し空気に人工呼吸管理を開始した。呼気炭酸ガス濃度を 30～35mmHg に維持した。平均動脈圧測定、採血及び薬剤投与目的に両側大腿動静脈にカテーテルを留置した。ラットは代用血漿製剤により無作為に 2 つのグループに分けられた。グループ 1 として人工赤血球製剤による血漿交換群、グループ 2 として 5%アルブミン溶液による血漿交換群とした (各々、n=8)。麻酔維持はラットの心拍数を

指標とし、420bpm/min 以上となったら Urethan 600mg/kg と α -Chloralose 60mg/kg の混合液を 0.5ml ずつ 30 分間隔で追加投与した。また、皮膚切開時には 1%Lidocaine による局所麻酔も併用した。カニューレーション終了後、それぞれの代用血漿製剤 10ml を大腿静脈より投与し、循環血液量過負荷とならないように同時に大腿動脈より 10ml の脱血を 10 分間で行った。血漿交換量はラットの循環血液量を 50ml/kg と想定し、約 50%の血漿交換を行うものと仮定した。脳虚血モデルの作成法は Longa らのモデルに準じて行った。左外頸動脈の分枝を結さつ後、切離した左外頸動脈より左内頸動脈方向へ、加工した 4-0 エチロン糸を挿入し、左頭頂葉に留置したドップラー血流計を指標とし、血漿交換後、循環動態が安定した時点で、左中大脳動脈を閉塞した。ドップラー血流計で脳血流量が 6unit 以下までの低下を目標とした。2 時間後、4-0 エチロン糸を抜去し再灌流した。再灌流 30 分後にラットを断頭し、TTC 染色を行い、脳梗塞領域を確認した。脳梗塞領域は画像解析ソフトを用いて全ての容積を加算した。脳梗塞出現組織はホ

ルマリン固定後、後日 HE 染色を行った。

(倫理面への配慮) 基礎麻酔として Urethan 600mg/kg と α -Chloralose 60mg/kg の混合液の腹腔内投与を行い、麻酔維持はラットの心拍数を指標とし、420bpm/min 以上となったら Urethan 600mg/kg と α -Chloralose 60mg/kg の混合液を 0.5ml ずつ 30 分間隔で追加投与した。また、皮膚切開時には 1%Lidocaine による局所麻酔も併用した。処置中は Pancronium 0.01mg/kg/min を持続投与し、循環動態より麻酔深度が十分であることを確認のうえ、断頭して安楽死とした。

C. 研究結果

採血所見による血漿交換前後のデータは、グループ 1 で pH:7.32→7.34、PaO₂(mmHg):118±16→104±36、PaCO₂(mmHg):44±6→41±6、Hb(g/dl):18±2→11±1、Ht(%):45±8→23±5、BS(mg/dl):111±19 であった。グループ 2 では pH:7.36→7.40、PaO₂(mmHg):107±13→85±18、PaCO₂(mmHg):43±11→38±4、Hb(g/dl):16±3→8±1、Ht(%):39±6→23±4、BS(mg/dl):93±12 であった。血漿交換前後の循環動態が安定した時点でのそれぞれの値は、グループ 1 で平均動脈圧(mmHg)が 108±21→80±17、心拍数(bpm/min)が 420±29→399±35、血漿交換後の脳血流量(unit)は 16.1±2.1 であった。左中大脳動脈閉塞後の脳血流量(unit)は 6.1±1.6 まで低下した。グループ 2 では平均動脈圧(mmHg)が 114±19→99±22、心拍数(bpm/min)が 404±52→422±30、血漿交換後の脳血流量(unit)は 16.5±2.8 であった。左中大脳動脈閉塞後の脳血流量(unit)は 6.1±1.6 まで低下した。TTC 溶液による染色の結果、非染色部位(梗塞領域)はグループ 1 で 4 例に、グループ 2 で 6 例に認めた。画像解析ソフトを用いた梗塞容積(mm³)はグループ 1 で 36.5±38.5、グループ 2 では 95.7±55.4 であった。

D. 考察

本研究で用いた人工赤血球製剤は高純度ヘモグロビンをリン脂質の二分子膜小胞体に内包させたもので、細胞型構造を特徴とし、赤血球に類似した機能を発現できるばかりでなく、酸素親和性、溶液物性は添加物の共存により容易に調整することが可能である。直径 250nm と微小であり、脳梗塞領域への血流を側副血行路の有無に関わらず、毛細血管を介することで維持する可能性があり、梗塞巣への酸素供給の結果、脳梗塞の新たな治療法となる可能性がある。本研究の結果から、人工赤血球製剤で血漿交換を行ったラットは 5%アルブミン溶液で血漿交換を行ったラットと比較し、局所脳虚血再灌流後の脳梗塞領域が有意に小さいことが明らかになった。5%アルブミン溶液と人工赤血球製剤で脳梗塞容積に有意差を認めたのは、人工赤血球製剤の組織への酸素運搬能が保持された結果と考えられる。しかし、脳組織における虚血再灌流障害に関しては急性期の変化にとどまらず、24~48 時間後に発症する遅発性神経細胞死を考慮した検討が必要と考えられる。今後は慢性実験における脳梗塞領域への影響も病理学的所見を含め研究していく計画である。

E. 結論

ラット局所脳虚血モデルを用いて脳虚血前に人工赤血球製剤及びアルブミン製剤にて血漿交換した際の脳梗塞領域サイズに与える影響について比較検討した。梗塞領域は人工赤血球製剤にて血漿交換を行った群で有意に低値を示した。人工赤血球製剤の梗塞部位への酸素供給液としての応用の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書

救急災害医療に利用可能な人工赤血球に関する研究

分担課題：ウサギ出血モデルにおける人工赤血球の臓器酸素分圧と血管透過性評価

分担研究者 小川 龍 日本医科大学麻酔科学教室 教授
研究協力者 坂本 篤裕 日本医科大学麻酔科学教室 助教授
寺嶋 克幸 日本医科大学麻酔科学教室 助手
杖下 隆哉 日本医科大学麻酔科学教室 助手

研究要旨

ウサギ急性出血性ショックモデルを作成し、Fluid Resuscitation を乳酸リンゲル液で行った。循環血液量の測定、晶質・膠質浸透圧、脳／肝臓／腎臓／骨格筋の酸素分圧を経時的に測定した。乳酸リンゲル液の Fluid Resuscitation は、一過性の循環改善効果が期待できそうであるが、その後の血漿成分の血管外漏出と臓器循環障害の可能性が示唆された。今後は、本モデルを使用して、人工赤血球の蘇生効果を検討する予定である。

A. 研究目的

出血性ショック時の人工赤血球による Fluid Resuscitation の効果と安全性を浸透圧と循環血液量、組織酸素分圧の変化から従来の輸液剤（乳酸リンゲル液等）と比較する。これにより、出血性ショック時の人工赤血球の急速投与による循環血液量増量効果／維持効果と臓器酸素化改善効果を明らかにする。晶質液による Fluid Resuscitation では、先行する出血性ショックによる非代償臓器血流を十分に回復することができないと思われる。これは、ショック時のケミカルメディエーター放出による血管内皮状態の変化に起因する。投与された晶質液は、血管外に漏出し血管内皮や間質の膨化を来し、十分な末梢循環改善効果が期待できない。これに対し、アルブミンヘム溶液は電解質と膠質の補充も同時に可能で、細胞外液補充液に比べ非代償臓器血流や酸素分圧の改善の効果がより期待できる。また、蘇生後の血管内ボリュームの保持の面からも安全性や効果性を明らかにする。

B. 研究方法

ニュージーランドホワイト系統のウサギ、雄、10-12 週齢、体重 1.8-2.4kg を対象とした。ケタラール 10mg/kg の筋注後、耳静脈より 22G テフロン針にて静脈を確保。ペントバルビタール 15mg/kg/hr の持続静注にて麻酔維持を行った。中枢側尾部に DDG-3300 (日本光電社製) の SpO₂ モニターを装着後、気管切開にて 3mm の気管内チューブを挿入。FiO₂=0.21, PCO₂=35-45mmHg となる様に人工呼吸を開始した。両兎径部より動脈カテーテルを挿入し、一方は観血的動脈圧モニターに、もう一方は採血・脱血の為に使用。また、兎径部より中心静脈カテーテルを挿入し中心静脈圧を測定した。小開頭・開腹、また兎径部より、大脳・肝臓・腎臓・Vastus lateralis muscles に酸素分圧電極 (栄行科学有限会社製) を挿入。血行動態安定後、動脈より血液ガス・浸透圧の為に 0.5ml 採血し、耳静脈よりインドシアニングリーン (ICG) 1mg(1ml) を投与し、DDG にて循環血液量を測定した。その後、平均血圧が 30-35mmHg (50% 循環血液量相当) となるまで 10 分以内で動脈よ

り脱血した。30分安定の後、同様に採血とICGの投与を行った。Fluid Resuscitationとして、脱血量と等量の乳酸リンゲル液を15分で静脈投与した。蘇生直後、60分後、120分後に同様の測定を行った。動脈血圧、中心静脈圧、臓器酸素分圧は持続的記録とした。

C. 研究成果

現在まで、安定したウサギ出血性ショックモデルにおける晶質浸透圧/膠質浸透圧測定、循環血液量測定、臓器酸素分圧測定モデルを作成した。また、乳酸リンゲル液によるFluid Resuscitationによる経時的な変化を測定できた。(n=5) 43±11mlの脱血にて出血性ショックを誘導し、平均血圧を82±9mmHgより33±1mmHgに低下させた。脈拍数は245±12/minuteより267±26/minuteと増加傾向を示し、心拍出量は250±74ml/minuteより121±10ml/minuteと減少傾向を示し、血管内ボリュームは169±25mlより101±27mlと低下傾向を示した。乳酸リンゲル液の投与後、平均血圧は84±7.6mmHgに回復し、脈拍数も248/minuteへと回復した。心拍出量は207±38ml/minute、血管内ボリュームは154±44mlへ回復したが蘇生2時間後にはいずれも低下傾向を示した。動脈血pH・Base Excessはショックにより低下傾向を示し、蘇生後もその低下傾向は遷延した。動脈血乳酸値はショックにより上昇傾向を示し、蘇生により回復傾向を示したものの、蘇生後2時間で再度上昇傾向を示した。大脳酸素分圧は観察中一貫して安定していたが、肝臓・腎臓・骨格筋酸素分圧は、ショックにより低下傾向を示し、蘇生後は一旦上昇したが再度低下傾向を示した。晶質浸透圧はショックにより増加傾向を示し、蘇生後も遷延した。膠質浸透圧は、ショックと蘇生により低下

傾向を示したが、蘇生2時間後に回復傾向を示した。

D. 考察

我々の作成した出血性ショックモデルでは、ショックにより循環血液量・心拍出量の低下を示し、蘇生により回復傾向を示した。しかし、これらの回復は一過性であり血管内ボリュームは蘇生後に血管外に漏出することが示唆された。これに伴い、肝臓や腎臓・骨格筋の循環低下が臓器酸素分圧低下に寄与したと思われる。出血性ショックと乳酸リンゲル液による蘇生は膠質浸透圧を低下させた。蘇生後の回復傾向は血漿成分の血管外漏出によると考えられる。乳酸リンゲル液による蘇生後の血管内ボリュームの維持効果には限界があるように思える。また、その後の血管外漏出は臓器微小循環を悪化させる可能性がある。

E. 結論

乳酸リンゲル液のFluid Resuscitationは、一過性の循環改善効果が期待できそうである。しかし、その後の血漿成分の血管外漏出と臓器循環障害の可能性はある。現在までの実験症例数は比較検討する為には少ないものである。今後、十分な実験症例数により明らかにしていく。また、人工赤血球との比較により、急性出血性ショック時における人工赤血球投与の影響を調査する。

F. 研究発表

Terajima K, Aneman A, Haljamae H. Haemodynamic effects of volume resuscitation by hypertonic saline-dextran (HSD) in porcine acute cardiac tamponade. *Acta Anaesthesiol Scand.* **48(1)**, 46-54 (2004).