

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：人工赤血球利用による心筋低酸素・再灌流障害の改善効果

分担研究者 佐久間一郎 北海道大学附属病院 講師

研究要旨

救急・災害医療に利用可能な人工赤血球として、細胞型のヘモグロビン(Hb)小胞体が有力な候補となっている。Hb 小胞体の心筋低酸素・再灌流障害における影響・効果を検索するため、モルモットを用いたランゲンドルフ摘出心灌流系を確立することを企図し、基礎検討を行った。灌流液として Krebs-Henseleit 液に 1%アルブミン (BSA) を加えて実施したところ、灌流停止・再灌流により、冠灌流の低下が認められた。さらに、再灌流後全例に心室粗細動が認められ、その後洞調律に戻ったものの、LVDP および O₂ extraction の低下が起これ、心筋障害が惹起されたことが確認された。本検討で用いた方法により、冠灌流減少・心筋障害が惹起されることが明らかとなり、Hb 小胞体投与の効果を評価するために望ましい測定系が構築できたと考えられた。

A. 研究目的

救急・災害医療に利用可能な人工赤血球として、細胞型のヘモグロビン小胞体(Hb 小胞体)が有力な候補となっている。Hb 小胞体を外傷、出血時に緊急投与する際には、心臓への影響、特に心筋低酸素・再灌流障害への留意が必要となる。また、Hb 小胞体は、外傷、出血時に緊急投与する用途以外に、急性冠症候群の際の心筋低酸素・再灌流障害に対し、その軽減を企図して積極的に投与される可能性がある。このような、心筋低酸素・再灌流障害に対する Hb 小胞体の影響・効果を検索するため、モルモットを用いたランゲンドルフ摘出心灌流実験系の確立をめざし、基礎検討を行った。

B. 研究方法

Hartley 系雄性モルモット (400-500g) を頸椎亜脱臼にて安楽死させ、心臓を摘出し、ランゲンドルフ法にて灌流を開始した。灌流

液としては Krebs-Henseleit 液 (KHS) : 118.2 mM NaCl, 4.83 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 2.37 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 2.5 mM NaHCO₃, 11.1 mM glucose (pH7.4) を用い、1%アルブミン (BSA) を添加して使用した。心臓表面温度 37°C、LVDP 10 mmHg、AOP 30 mmHg、95%O₂・5%CO₂ 通気 (0.25 L/min) の条件で実験を実施した。

灌流方法としては、まず 30 分間 KHS 灌流により安定化後、さらに 30 分間灌流液を用いて灌流した (baseline)。その後 30 分間灌流を停止し、次いで 45 分間再灌流を実施した。Baseline、再灌流直後、再灌流 10 分後および再灌流 45 分後に各測定項目を評価した。

測定項目は、心機能評価として心拍数 (counts/min)、Coronary flow rate (g/ml/min)、Developed Pressure (LVESP・LVDP)、心筋酸素供給・消費の指標として O₂ extraction、再灌流性不整脈としては、心室粗細動 (VF) 出現率および VF 持続時間を観察した。

C. 研究結果

KHS+BSA 1% 群の血行動態の結果 (n=7) は、心拍数 (baseline $238.24 \pm 3.24/\text{min}$ 、再灌流直後 VF、再灌流 10 分後 $204.39 \pm 23.93/\text{min}$ 、再灌流 45 分後 $206.06 \pm 12.10/\text{min}$)、LVDP (baseline 43.43 ± 2.19 、再灌流直後 VF のため測定不能、再灌流 10 分後 20.00 ± 3.30 、再灌流 45 分後 22.71 ± 3.34)、coronary flow rate は (baseline $5.37 \pm 0.31 \text{g/ml/min}$ 、再灌流直後 $4.24 \pm 0.58 \text{g/ml/min}$ 、再灌流 10 分後 $3.91 \pm 0.50 \text{g/ml/min}$ 、再灌流 45 分後 $3.68 \pm 0.45 \text{g/ml/min}$)であった。

心筋酸素代謝の指標は O_2 extraction が baseline $65.16 \pm 3.56\%$ 、再灌流直後 $66.55 \pm 3.04\%$ 、再灌流 10 分後 $53.62 \pm 4.43\%$ 、再灌流 45 分後 $58.04 \pm 3.98\%$ であった。再灌流不整脈 (VF) の出現率は 7/7 と 100%であり、またその持続時間は $358.71 \pm 25.80 \text{ sec}$ であった。

D. 考察

本検討で用いたランゲンドルフ摘出心灌流系により、KHS+BSA 1% 群での冠灌流の低下が認められた。さらに、再灌流後全例に VF が認められ、その後洞調律に戻ったものの、LVDP および O_2 extraction の低下が起り、心筋障害が惹起されたことが確認された。このように、心筋低酸素・再灌流が惹起されることが明らかとなり、Hb 小胞体投与の効果を評価するために望ましい測定系が構築できたと考えられる。

今後 Hb 小胞体の心筋低酸素・再灌流への効果を KHS+BSA 1%群に加え、Hb 小胞体 1 mg/ml 群、Hb 小胞体 0.1 mg/ml 群、モルモット赤血球群で検討を行う。さらに Hb 小胞体を投与する際には、灌流停止前 (preconditioning) および再灌流時 (reperfusion) の 2 つの投与方法を行い、計 5 群を加えて検討する予定である。

また、心筋酸素供給・消費の指標として MVO_2 、Cardiac Efficiency を、生化学的検査

として、再灌流時のノルエピネフリン (NE) 放出量、クレアチニンキナーゼ (CK) 放出量、乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出量を測定する予定である。また、組織学的検査として、各群 n=7 のうち、n=5 は左心室のみとして PBS 緩衝液で一回洗浄後、液体窒素で凍結し、その後 -80°C で保存。残りの n=2 は左心室のみとして PBS 緩衝液で一回洗浄後、10%ホルマリンで固定する。その後、HE 染色を行い心臓損傷程度を検討する予定である。

E. 結論

心筋低酸素・再灌流障害に対する Hb 小胞体の影響・効果を検索するため、モルモットを用いたランゲンドルフ摘出心灌流実験系の確立を企図して基礎実験を行った。KHS+BSA 1% を用い、灌流停止・再灌流を行うことにより、冠灌流減少・心筋障害が惹起され、Hb 小胞体の評価するために望ましい測定系が構築されたと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakai K, Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Sugawara T, Satoh H, Kitabatake A: S-nitrosylated poly-ethylene glycol-conjugated hemo- globin derivative as a candidate material for oxygen therapeutics. *Adv Exp Med Biol* **519**, 207-216 (2003).

2. 佐久間一郎: Hb 修飾型人工血液と PFC. *周術期輸液の最前線*. 宮尾秀樹編、真興交、東京、in press 2004

2. 学会発表

1. Satoshi Fujii, Hitomi Fujii, Ichiro Sakuma, Kunihiko Nakai, Hiroshi Sato, Osamu Kenmotsu, Akira Kitabatake/Hypothermia induced platelet activation can be blunted by artificial red blood cells: potential clinical implications/第 42 回日本エム・イー学会大会/2003.6.3-5/札幌

2. Polyethylene Glycol Conjugated

S-Nitrosylated Hemoglobin Potently Inhibits PAI-1 Production in Human Liver Derived Cells: Therapeutic Implications Against Atherothrombus / 第 42 回日本エム・イー学会大会 / 2003.6.3-5 / 札幌

3. 菅原 武、佐久間一郎、坂野上淳、富樫廣子、仲井邦彦、吉岡充弘、佐藤 洋、田村守、北島 颯 / 脱血ショック下におけるヘモグロビン修飾体、SNO-Hb の酸素運搬能 / 第 42 回日本エム・イー学会大会 / 2003.6.3-5 / 札幌

4. 菅原 武、富樫廣子、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 颯 / SNO-PEG-ヘモ

グロビンの生体適合性: ラットにおける検討 / 第 42 回日本エム・イー学会大会 / 2003.6.3-5 / 札幌

5. Ichiro Sakuma, Akira Kitabatake / s-Nitroso-Hemoglobin and Autoregulation of Capillary Blood Flow / The 1st Meeting of Cardiovascular Physiome / 2003.12.7. / Okayama, Japan.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 北島 颯、佐久間一郎、安河内徹、仲井邦彦: 北海道大学、日本油脂: 一酸化窒素代謝物-ポリオキシアルキレン-ヘモグロビン結合体. 米国特許番号 6667292, 2003.12.23

別添 6

表 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
<i>胸部外科</i> 56, 276-9 (2003). “Fontan 手術の成績は段階的戦略により向上したか？”	2003 年 4 月	南江堂	飯野与志美 饗庭 了 橋詰賢一 古泉 潔 加藤木利行 四津良平
<i>Jap J Thorac Cardiovasc Surg.</i> 51, 302-7 (2003). “The limitation of staged repair in the surgical management of congenital complex heart anomalies with aortic arch obstruction.”	2003 年 7 月	The Japanese Association for Thoracic Surgery	R. Aeba T. Katogi K. Hashizume Y. Iino K. Koizumi K. Hotoda S. Inoue H. Matayoshi A. Yoshitake R. Yozu
<i>Ann Thorac Surg.</i> 76, 1073-7 (2003). “Liberal use of tricuspid valve detachment for transatrial ventricular septal defect closure.”	2003 年 7 月	Elsevier Inc.	R. Aeba T. Katogi K. Hashizume K. Koizumi Y. Iino M. Mori M R. Yozu
<i>Ann Thorac Surg.</i> 76, 1383-8 (2003). “Apico-pulmonary artery conduit repair of congenitally corrected transposition of the great arteries with ventricular septal defect and pulmonary outflow tract obstruction.”	2003 年 7 月	Elsevier Inc.	R. Aeba T. Katogi K. Koizumi Y. Iino M. Mori R. Yozu
<i>Artificial Organs</i> 27(1), 34-40 (2003). “Computational Fluid Dynamics Analysis of an Intra-Cardiac Axial Flow Pump”	2003 年 1 月	Blackwell Publishing, Inc.	A. Mitoh T. Yano K. Sekine Y. Mitamura E. Okamoto D.-W. Kim R. Yozu S. Kawada
<i>ASAIO JOURNAL ABSTRACTS</i> 49(2), 159 (2003). “A SAFE, DURABLE, NON-POWER CONSUMPTIVE, SIMPLE SEAL FOR ROTARY BLOOD PUMPS.”	2003 年 6 月		Y. Mitamura K. Sekine S. Murabayashi E. Okamoto R. Yozu
<i>Artificial Organs</i> 27(10), 892-896 (2003). “Development of a Magnetic Fluid Shaft Seal for an Axial-Flow Blood Pump”	2003 年 7 月	Blackwell Publishing, Inc.	K. Sekine Y. Mitamura S. Murabayashi I. Nishimura R. Yozu D.-W. Kim
<i>Mebio</i> 5 20(5), 91-95 (2003). “低侵襲心臓弁膜症手術の最前線 Port-Access MICS からロボット支援下心臓手術まで”	2003 年 5 月	メジカルビュー社	飯野与志美 申 範圭 四津良平

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
<i>Clinical Engineering</i> 14(8), 857-865 (2003). “陰圧吸引補助脱血体外循環の有効性と問題点-3学会合同陰圧吸引補助脱血体外循環検討委員会報告書より-”	2003年8月	秀潤社	許 俊鋭 高本真一 四津良平 坂本 徹 又吉 徹 見目恭一
心臓 HEART 35(11), 725-729 (2003). “心臓外科の新しい strategy-低侵襲心臓手術(MICS)-”	2003年11月	丸善株式会社	吉武明弘 四津良平
臨床外科 58(13), 1597-1603 (2003). “低侵襲心臓手術における手術器具の発展と改良”	2003年12月	医学書院	森 光晴 四津良平
ハートナーシング 17(1), 35-39 (2004). “低侵襲心臓手術(MICS)”	2003年1月	株式会社メディカ出版	吉武明弘 四津良平
ハートナーシング 17(3), 65 (2004). “特集 循環を補助する医療機器を理解しよう”	2003年3月	株式会社メディカ出版	四津良平
<i>Internat Congress Series</i> 1255, 95-97 (2003). “Genetic polymorphisms in the promoter region of interleukin-8”	2003年4月	Elsevier Science B.V.	S. Fujishima S. Aiso S. Hori K. Aoki N. Aikawa
<i>Shock</i> 18, 15-20 (2003). “熱傷ショックの病態と治療法の変遷”	2003年4月		相川直樹
総合臨床 52(5), 1651-1654 (2003). “SIRS; Systemic inflammatory response syndrome”	2003年5月	永井書店	相川直樹 藤島清太郎 田熊清継
<i>J. Biomed. Mater. Res.</i> 64A, 48-51 (2003). “Oxygenation of hypoxia region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic Hemes”	2003年4月	Wiley Periodicals, Inc.	K. Kobayashi T. Komatsu A. Iwamaru Y. Matsukawa M. Watanabe H. Horinouchi E. Tsuchida
<i>J. Biomed. Mater. Res.</i> 64A, 257-261 (2003). “Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging”	2003年5月	Wiley Periodicals, Inc.	E. Tsuchida T. Komatsu Y. Matsukawa A. Nakagawa H. Sakai K. Kobayashi M. Suematsu
<i>J. Biomed. Mater. Res.</i> 66A, 292-297 (2003). “Compatibility <i>in vitro</i> of albumin-heme (O ₂ -carrier) with blood cell components”	2003年5月	Wiley Periodicals, Inc.	Y. Huang T. Komatsu A. Nakagawa E. Tsuchida S. Kobayashi

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
<i>Crit. Care Med.</i> 32 , 539-545 (2004). “Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats”	2004年2月	Lippincott Williams & Wilkins	H. Sakai Y. Masada H. Horinouchi M. Yamamoto E. Ikeda S. Takeoka K. Kobayashi E. Tsuchida
<i>Chem. Lett.</i> 32 , 504-505 (2003). “Synthetic dioxygen-carrying hemoprotein: human serum albumin including iron(II) complex of protoporphyrin IX with an axially coordinated histidylglycyl-propionate”	2003年5月	The Chemical Society of Japan	A. Nakagawa, T. Komatsu, N. Ohmichi E. Tsuchida
<i>Chem. Eur. J.</i> 9 , 4626-4633 (2003). “Molecular energy and electron transfer assemblies made of self-organized lipid-porphyrin bilayer vesicles”	2003年5月	Wiley-VCH	T. Komatsu M. Moritake E. Tsuchida
<i>BMC Structural Biology</i> 3 , 6 (2003). “Crystal structural analysis of human serum albumin complexes with hemin and fatty acid”	2003年7月	BioMed Central	P. A. Zuszain J. Ghuman T. Komatsu E. Tsuchida S. Curry
<i>Macromol. Symp.</i> 195 , 275-280 (2003). “Coordination structure of active site in synthetic hemoprotein (albumin-heme) with dioxygen and carbon monoxide”	2003年8月	Wiley-VCH	E. Tsuchida, A. Nakagawa T. Komatsu
<i>Polym. Adv. Technol.</i> 14 , 729-732 (2003). “Microcalorimetry investigation of syntehtic hemoprotein (albumin-heme)”	2003年8月	John Wiley & Sons, Ltd	Y. Huang T. Komatsu E. Tsuchida
人工血液 11 , 167-172 (2003). “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”	2003年9月	日本血液代替物学会	小松晃之 石原星児 土田英俊
<i>Macomol. Symp.</i> 204 , 13-18 (2003). “Oxygen-carrying plasma hemoprotein Albumin-heme: Nitric oxide binding and physiological responses after administration in vivo”	2003年9月	Wiley-VCH	E. Tsuchida T. Komatsu
<i>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> 285 , H1140-H1147 (2003). “Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O ₂ affinity”	2003年5月	the American Physiological Society	C. Contaldo S. Schramm R. Wettstein H. Sakai S. Takeoka E. Tsuchida M. Leunig A. Banic D. Erni
<i>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> 285 , H2543-H2551 (2003). “O ₂ -Release from Hb-Vesicles Evaluated Using an Artificial Narrow O ₂ -Permeable Tube: Comparison with RBC and Acellular Hb”	2003年7月	the American Physiological Society	H. Sakai Y. Suzuki M. Kinoshita S. Takeoka N. Maeda E. Tsuchida

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
<i>Bioconjugate Chem.</i> 14 , 1171-1176 (2003). “The prolonged oxygen –carrying ability of Hb vesicles by coencapsulation of catalase <i>in vivo</i> ”	2003 年 10 月	E American Chemical Society	Y. Teramura H. Kanazawa H. Sakai S. Takeoka E. Tsuchida
<i>Biotechnol Prog.</i> , 19(5) , 1547-52 (2003). “Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion”	2003 年 10 月	American Chemical Society	K. Sou Y. Naito T. Endo T S. Takeoka E. Tsuchida
人工血液 11 , 173-178 (2003). “酸素輸液へ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”	2003 年 10 月	日本血液代替物学会	久本秀治 酒井宏水 福富一平 宗 慶太郎 武岡真司 土田英俊
<i>J. Pharm. Sci.</i> 93 , 310-321 (2004). “Detection of Lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by <i>Limulus</i> amebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gell clotting analysis and pretreatment with a surfactant”	2004 年 2 月	Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association	H. Saka S. Hisamoto I. Fukutomi K. Sou S. Takeoka E. Tsuchida.
<i>Acta Anaesthesiol Scand.</i> 48(1) , 46-54 (2004). “Haemodynamic effects of volume resuscitation by hypertonic saline-dextran (HSD) in porcine acute cardiac tamponade”	2004 年 1 月	Blackwell Publishing	K. Terajima A. Aneman H. Haljamae
<i>Adv Exp Med Biol</i> 519 , 207-216 (2003). “S-nitrosylated poly- ethylene glycol-conjugated hemo- globin derivative as a candidate material for oxygen therapeutics”	2003 年 5 月	Kluwer Academic/Plenum Publishers	K. Naka I. Sakuma H. Togashi M. Yoshioka T. Sugawara H. Satoh A. Kitabatake
人工臓器 32 , 29-36 (2003). 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.	2003 年 1 月	日本人工臓器学会	土田英俊
医学のあゆみ 205 , 558-566 (2003) 酸素輸液(人工赤血球).	2003 年 5 月	医歯薬出版株式会社	土田英俊 酒井宏水 武岡真司 宗 慶太郎 小林紘一
麻酔 53 (増刊号) S55-S66 (2003) 酸素輸液(人工赤血球)の安全度と体組織への酸素供給.	2003 年 12 月	克誠堂出版株式会社	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
人工血液 11 , 211-214 (2003). 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.	2003 年 12 月	日本血液代替物学会	酒井宏水 土田英俊
<i>TMDC MATE</i> 233 , 4-5 (2004). 酸素輸液の安全性と人工赤血球としての効果.	2004 年 1 月	東京医師歯科医師共同組合	土田英俊

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
<i>Biomaterials</i> 25, (2004). "Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model."	印刷中	Elsevier Ltd.	H. Sakai H. Horinouchi Y. Masada S. Takeoka M. Takaori K. Kobayashi E. Tsuchida.
<i>ASAIO J.</i> (2004). "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)."	印刷中	Lippincott Williams & Wilkins	A. Yoshizu Y. Izumi S. Park H. Sakai S. Takeoka H. Horinouchi E. Tsuchida K. Kobayashi
<i>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.</i> (2004). "Hyperoxia-induced Emphysematous Changes in Subacute Phase of Endotoxin-induced Lung Injury in Rats."	印刷中	the American Physiological Society	M. Kohno A. Ishizaka M. Sawafuji H. Koh Y. Hirayama E. Ikeda T. Shiomi A. Ohashi Y. Okada K. Kobayashi
<i>Proc. IX Int. Symp. Blood Substitute</i> , Springer-Verlag (2004). "Approach to clinical trial considering medical ethics and efficacy for HbV, liposome encapsulated hemoglobin vesicle"	印刷中	Springer-Verlag	M. Takaori
<i>Proc. XIII Keio Univ. Int. Symp. Life Sci. & Med.</i> , Springer Verlag (2004). "Studies on red cell substitute in Japan and perspective in the future"	印刷中	Springer-Verlag	M. Takaori
In: <i>Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine</i> Vol.12, Springer-Verlag (2004). "Safety and Efficacy of Hemoglobin -Vesicles and Albumin-Hemes".	印刷中	Springer-Verlag	K. Kobayashi H. Horinouchi M. Watanabe Y. Izumi Y. Teramura A. Nakagawa Y. Huang, K. Sou H. Sakai, T. Komatsu S. Takeoka E. Tsuchida
In: <i>Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine</i> Vol.12, Springer-Verlag (2004). "Hemoglobin-vesicles (HbV) as Artificial Oxygen Carriers"	印刷中	Springer-Verlag	H. Sakai, K. Sou S. Takeoka K. Kobayashi E. Tsuchida
「新訂版・表面科学の基礎と応用」第12節、(2004). "人工赤血球"	印刷中	エヌ・ティー・エス社	土田英俊、武岡真司、小松晃之、酒井宏水
周術期輸液の最前線。宮尾秀樹編 (2004) "Hb 修飾型人工血液と PFC"	印刷中	真興交易	佐久間一郎

研究成果による知的所有権の取得状況

該当なし

その他刊行物

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)

200300857A

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P42の研究成果の刊行に関する一覧表をご参照ください。