

200401225A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究

(研究課題番号：H16-医薬-069)

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 四津良平

(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 17 (2005) 年 4 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究

(研究課題番号：H16-医薬-069)

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 四津良平

(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 17 (2005) 年 4 月

別添 2

目次

I. 総括研究報告書	1~5
四津良平（慶應義塾大学医学部 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 四津良平（慶應義塾大学医学部 教授）	6~9
2. 相川直樹（慶應義塾大学医学部 教授）	10~16
3. 小松晃之（早稲田大学 理工総研 助教授）	17~32
4. 堀之内宏久（慶應義塾大学医学部 講師）	33~40
5. 外須美夫（北里大学医学部麻酔科学 教授）	41~43
6. 小川 龍（日本医科大学麻酔科学教室 教授）	44~48
7. 大鈴文孝（防衛医科大学校第 1 内科学教室 教授）	49~52
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53~60
IV. 研究成果の刊行物・別冊	61~

救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究

主任研究者 四津良平 慶應義塾大学医学部 外科 教授

研究要旨

救急医療で輸血が果たす役割は非常に重要であるが、輸血は交差試験を必要とし、保存、輸送に注意を払わなければならない。何時でも何処でも使用できる人工赤血球の開発は救急・災害医療のみならず、次世代医療に必要不可欠であると考えられる。本研究では救急、災害医療に利用可能な人工赤血球を開発するためにヘモグロビン小胞体(Hb 小胞体)およびアルブミン-ヘムの生体内での効果を研究、救急医療での用途についても検討するとともに長期保存、備蓄法を検討する。早稲田大学理工総研で開発された Hb 小胞体は、期限切れの輸血用血液より Hb を分離・精製し、リン脂質小胞体に内包した平均粒径 250 nm の小胞体であり、本年度より委託製造が行なわれ、安定的に均質な試料が供給されるようになった。また、アルブミン-ヘムも早稲田大学理工総研で開発された人工酸素運搬体で、人工合成のヘムをリコンビナントヒトアルブミンに包接させた物質である。平成16年度は15年度の研究を踏まえ、血液希釈状態での出血性ショック時のアルブミン-ヘムの蘇生効果について循環動態と酸素動態の点から検討し、アルブミン-ヘムは蘇生に有効で、臨床で使用される晶質液や膠質液に比して優れている結果が得られた。脳虚血モデルでは、梗塞巣の明らかな縮小は認められなかったが、心筋虚血モデルでは、Hb 小胞体が虚血の影響を軽減させることが示された。また、虚血領域での酸素放出挙動は酸素親和性を高めた Hb 小胞体が組織の Hypoxia を軽減させることが明らかとなった。

救急領域での使用には血中でヘモグロビンがメト化するのを抑制する系を内包していることが望ましく、L-Tyrosine による過酸化水素消去系を内包した Hb 小胞体を開発した。この新小胞体は内包したヘモグロビンのメト化を抑制できる可能性が示された。アルブミン-ヘムの合成では包接するヘムの構造を一部改変して工程を簡略化できることが明らかとなった。今後、生体適合性、機能についての検討が必要である。

人工血液をどのような形で保存し、運搬するかは救急・災害医療に直結する問題であり、パッケージングに必要な基本性能が明らかとなり、今後具体的なパッケージングと封入法について検討する必要があると考えられた。

本年度は研究に格段の進歩が得られたとともに解決すべき問題点も明らかとなり、来年度の研究が重要な意義を持つと考えられた。

分担研究者

小川 龍	日本医科大学麻酔科	教授	大鈴木文孝	防衛医科大学校第1内科学	教授
外須美夫	北里大学医学部麻酔科	教授	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部外科	講師
相川直樹	慶應義塾大学医学部救急医学	教授	小松晃之	早稲田大学理工総研	助教授

A. 研究目的

本年度は、昨年度の結果を踏まえ、救急・災害医療に利用可能な人工赤血球としてヘモグロビン小胞体(Hb 小胞体)とアルブミン-ヘムを用いて動物を用いて以下の点について検討することを目的とした。①出血性ショックに対するアルブミン-ヘムの蘇生液としての効果を循環動態の面および酸素運搬の点から検討する。②出血性ショックに於ける Hb 小胞体の蘇生効果と血管透過性の変化について評価する。③脳虚血に対する Hb 小胞体の効果について検討する。④心筋虚血に対する Hb 小胞体の効果について検討する。⑤人工心肺の補填液としての Hb 小胞体の効果と神経学的な変化を検討する。⑥ハムスター背部皮下の微小循環を観察し、血管内酸素分圧を測定することによって Hb 小胞体の酸素放出挙動について検討する。

ついで、物性の改良を目的として Hb 小胞体のメト化を抑制するために L-Tyrosine が過酸化水素消去系として果たす役割を検討した。また、アルブミンの製造工程を簡略化し、しかも機能を損なわない物質を開発するため、ポルフィリンの α 位のシクロヘキサノイル基を 3 箇所にした新規物質を作成、*in vitro* で酸素結合能、解離曲線を検討する。さらに備蓄、貯蔵、運搬に適したパッケージングについて検討することも目的とした。

B. 研究方法

昨年度の研究結果を踏まえ、本年度は動物実験として以下の方法を用いた。①ラットを用い、体外循環補填液として Hb 小胞体を 5%リコンビナントヒトアルブミン生食に分散した液体を用いて体外循環を確立、無呼吸下で 90 分の体外循環を施した後に体外循環から離脱し、生存させた。この後に高次脳機能の変化について迷路試験を行って検討した。対照群では 5%リコンビナントヒトアルブミン生食液を用いた。②ビーグル犬を用い、5%リコンビナントヒトアルブミン生食で 75%の血液交換を行って急性の血液希釈状態を作成し、その上

で 30%の脱血を行い出血性ショック状態を作成、蘇生液としてアルブミン-ヘムを用い、生体適合性、蘇生効果について循環動態、および酸素運搬の面から解析、検討した。対照群には蘇生液として 5%リコンビナントヒトアルブミン生食を用いた群と Lactate Ringer 液を用いた群を設定した。③ウサギを用い、脱血を行なって平均血圧 30-35 mmHg のショック状態を 30 分間保持し、出血性ショックの蘇生液として Hb 小胞体を用い蘇生効果の検討を行うとともに、血管透過性の変化について検討した。④ラットを用い、Hb 小胞体にて約 30%の血液置換を行った後、中大脳動脈を一時的に閉塞する手技を用いて急性の脳虚血を作成、2 時間後に閉塞を解除して生存させ、2 日後に梗塞巣の変化について検討した。⑤ラット心を用い、ランゲンドルフ灌流を確立、30 分間の虚血状態を作成した後に Hb 小胞体にて灌流し、心収縮能について検討した。⑥ハムスターを用い Dorsal skinfold window model を作成、皮下微小血管を観察し、Hb 小胞体を投与した後に微小な虚血領域を作成、血管内酸素分圧を Pd コプロポルフィリンの燐光の消失曲線から求めた。

In vitro においてヒト全血に Hb 小胞体を混じて血液凝固の変化を臨床用の機器を用いて測定した。

物性の改良の面からは Hb 小胞体内に L-Tyrosine を内包し、メト化した Hb と共存させることによって過酸化水素を消去する可能性について *in vitro* およびラットを用い *in vivo* でも検討した。また、アルブミン-ヘムの合成を簡略化するためにポルフィリンに付加する α 位のアミノフェニル基を 3 箇所に限定した(現在は 4 箇所)物質を作成、*in vitro* で酸素結合能、運搬能について検討した。

更に備蓄、貯蔵、運搬に適したパッケージングの性能概要の検討を行なった。

C. 結果

動物実験では以下の結果が得られた。①ラットにおける体外循環の確立、体外循環中の呼吸停止

が可能であった。また、Hb 小胞体で体外循環を 90 分間施行した後に離脱させ、離脱後 7 日以上長期生存させることができた。高次脳機能として迷路試験を行い、対照群に比較して Hb 小胞体群は到達時間が有意に短く、高次脳機能障害が低減していた。②ビーグル犬を用いた検討では対照群のうち、LR 群では蘇生後もショック状態から離脱できず、死亡した。また、5%リコンビナントヒトアルブミン生食を用いた群も大半はショックから離脱できなかった。アルブミン-ヘムを用いた群ではショックから離脱し、循環動態も安定して経過した。蘇生後の体血管抵抗、肺血管抵抗も異常値を取ることなく、右心系も投与後肺高血圧症となることなく経過した。LR 群、5%リコンビナントヒトアルブミン群では蘇生後酸素運搬が低下し、組織の酸素代謝の改善も認められなかったが、アルブミン-ヘム投与群では酸素運搬、酸素消費も蘇生後安定した。アルブミン-ヘムの血中半減期は約 70 分であった。③ウサギを用いた出血性ショックの蘇生では Lctate Ringer 液で蘇生した群では一過性の循環改善効果が得られたが、血漿成分の血管外漏出と臓器、全身の循環不全や低酸素障害が認められた。Hb 小胞体を用いた群では酸素消費量がショック前値に回復し、混合静脈血酸素飽和度の上昇が認められた。④あらかじめ Hb 小胞体によって血液を置換し、ラット中大脳動脈を閉塞する脳虚血モデルでは脳梗塞巣を縮小させる明確な効果は認めなかった。⑤ラット心を用いたランゲンドルフ灌流系では 30 倍希釈の灌流液によって灌流することにより、虚血後の心機能の回復が明らかであった。また、Hb を含まない空の小胞体によって行なわれた同様の実験でも心機能の回復が認められた。Hb 小胞体を 100 倍希釈して灌流液に混じ、灌流した際には心機能の回復は認められなかった。⑥ハムスターを用い Dorsal skinfold window model では、皮下微小血管を観察し、Hb 小胞体を投与した後に微小な虚血領域を作成、血管内酸素分圧を Pd コプロポルフィリンの燐光の消失曲線から求め、

酸素高親和性の Hb 小胞体と酸素低親和性の Hb 小胞体とを比較し、虚血領域では酸素高親和性の Hb 小胞体が虚血領域の酸素分圧を維持するのに有効であることが明らかとなった。

In vitro でのヒト血液を用いた実験では凝固系に明らかな異常を認めなかった。

物性の改良の面からは Hb 小胞体内に L-Tyrosine を内包し、メト化した Hb と共存させることによって過酸化水素を消去する可能性について in vitro での検討では投与した過酸化水素がメト Hb と Tyrosine の相互作用によって消去されることが明らかとなった。この L-Tyrosine 内包 Hb 小胞体をラットに投与したところ、明らかな毒性を示さなかった。

アルブミン-ヘムの合成を簡略化するためにポルフィリンに付加する α 位のアミノフェニル基を 3 箇所に限定した(現在は 4 箇所)物質を作成、in vitro で酸素結合能、運搬能について検討したところ、工程数の減少が可能であり、新規物質では酸素親和性が若干低下していた。

更に備蓄、貯蔵、運搬に適したパッケージングの性能概要の検討を現在薬剤のパッケージングに用いられている PVC 膜の特性から検討し、ガスバリア性が高く、可塑剤を必要としない材質で二重包装とし、外装はアルミパックとするなど基本要件性能の概要が明確となった。

D. 考察

救急・災害医療に必要な人工血液が持つべき条件として、貯蔵、運搬に適し、何時でも何処でも使用できる性能を持つことが重要である。また、救急医療において赤血球製剤の代替のみでなく、虚血性疾患や心臓手術時の利用なども考えられている。本年度は Hb 小胞体の供給体制を委託製造とすることで安定したので、動物実験による研究が進んだ。

体外循環の補填液としての使用は心臓血管外科

の手術、特に新生児、乳児の手術において血液の使用を低減あるいは不必要とする可能性があり、緊急手術の際に得られる利益は大である。新生児や乳児の体外循環で血液を用いないで体外循環を行うと、神経学的な発達遅滞が起こることが報告されており、この点で人工血液が輸血に変わる酸素運搬体として使用できるかを検討することが本実験の目的であった。ラットにおいて体外循環を確立し、無呼吸、90分の運転を行った後の検討で、Hb小胞体使用群で神経学的な回復が優れていた。この結果は今後臨床に応用するために大きなステップとなると考えられた。

また、ビーグル犬を用いたショック蘇生実験では、対照群を5%リコンビナントヒトアルブミン生食とした。アルブミン生食は単独でショックに対する蘇生液としての能力が高く、通常の出血性ショックモデルにおいてはアルブミン-ヘムとの間に差を見出すことが困難であった。平成16年度はこの問題を克服するために、出血性ショックモデルを数種類検討し、75%血液交換による急性血液希釈モデルを用いることとした。このモデルでは、希釈後のHb濃度は3.2g/dlであり、これ以上の血液希釈では、赤血球による酸素運搬ができなくなり、組織の低酸素障害が著しくなり、死亡するにいたる。今回のモデルでは全身麻酔下、自発呼吸としたので、脳の低酸素症はそのまま死亡につながることになる。この条件で実験を行った結果、アルブミン-ヘムによる蘇生ではショックを離脱し、循環動態、酸素動態を安定化させることが可能であった。一方、5%リコンビナントヒトアルブミン生食やLactate Ringer液では一時的な血圧の上昇を認めてもショックから離脱できず、臓器機能を失って死亡した。アルブミン-ヘムが血漿膠質浸透圧の維持のみならず酸素運搬を行うことがショック蘇生に有効であったことを示していると考えられた。

ウサギにおける脱血ショックの実験ではショックからの回復も速やかで、Hb小胞体の投与により、

酸素代謝が早期に回復し、血管透過性の亢進も少なかった。この結果は出血性ショック時の臓器不全の原因である循環不全と低酸素障害をともに改善する点で意義があると考えられた。

ラットにおける大脳の虚血再灌流時の梗塞巣の評価モデルではHb小胞体をあらかじめ投与した場合には梗塞巣の明らかな減少は認められなかった。梗塞巣の大きさは虚血時間、虚血後の血流の状態、血液の状態によって変化することを考えると、この結果はHb小胞体の投与時期、投与量などの点を考慮したり、異なったタイプの人工酸素運搬体を用いて研究を続ける必要があると考えられた。

ラット心を用いたランゲンドルフ灌流系の実験でHb小胞体、およびHbを含まない空小胞体を用いた灌流で、虚血後の心機能の回復が良好であったことは、心筋梗塞や狭心症などの虚血性心疾患において治療薬として使用できる可能性を示唆した。

Hamster Dorsal Skin Chamberを用いた微小循環でのHb小胞体の酸素放出挙動の解析では、虚血領域で酸素親和度の高いHb小胞体がゆっくりと酸素を放出して急激な低酸素となるのを防いでいることが明らかとなり、虚血性疾患に使用する場合、Hb小胞体の特性を変更したほうがよい可能性が示唆された。

ヒト全血を用いた凝固能の変化に関する実験ではHb小胞体添加群とアルブミン生食添加群で双方とも有意差を認めなかったことは、血小板の活性化が認められない点で有利であると考えられた。

物性の改良の面からはHb小胞体内にL-Tyrosineを内包した場合、Hbのメト化を抑制することが明らかとなり、動物に投与して明らかな毒性を示さなかったため、Hb小胞体の生体内での機能を長期化させる上で有望であると考えられた。

アルブミン-ヘムの合成の簡略化で得られた新規物質は酸素親和性は若干低下するが、工程数が少なく、製造が簡略化されるため収率も高いと考

えられ、この物質についても安全性と効果について検討してゆく必要があると考えられた。

さらに備蓄、貯蔵、運搬に適したパッケージングの性能概要が明らかとなったので、今後具体的なパッケージングの方法も含めて検討することが必要であると考えられた。

E. 結論

本年度は救急・災害医療にターゲットを絞り動物実験と物性の改良、および保存におけるパッケージングについて検討し、動物実験で多くの結果が得られ、臨床研究に進む上で貴重な成果が得られた。体外循環の成功と体外循環後の速やかな神経学的回復が認められたことは臨床での問題点を解決する可能性があると考えられた。また、出血性ショックにおいてアルブミン-ヘムが蘇生効果、酸素代謝の点で優れた薬理作用を示すことが明らかとなった。ウサギを用いた出血性ショックに対する Hb 小胞体の投与は酸素代謝を速やかに改善させ、血管透過性を維持した点で有効な組成液であると考えられた。虚血性疾患の治療を目標とした動物実験では脳虚血に対する効果が十分とはい

えなかったが、心筋虚血については良好な結果が得られた。脳虚血については今後条件を変更して検討を行う必要があると考えられた。ハムスターの微小循環を検討し、虚血領域での酸素放出挙動の解析から、酸素親和度の高い Hb 小胞体が虚血領域で酸素分圧を保つ可能性が示唆され、今後の虚血性疾患の治療薬としての人工酸素運搬体の改良と評価が重要であると考えられた。

新規物質として Hb 小胞体のメト化を防ぐ L-Tyrosine 含有 Hb 小胞体が開発され、生体適合性と効果についての評価を今後も引き続き行う必要がある。アルブミン-ヘム合成の工程数の減少が可能となった新規物質についても今後の生態適合性と効果についての評価が重要である。

救急医療で使用できるパッケージングの開発は要求性能が明らかとなったので要求項目を解決できるパッケージを今後具体的に構成する必要がある。

本年度は分担研究での基礎検討が済み、評価すべき結果が多く報告された。問題点も指摘され、次年度での新たな研究の進捗が期待される。

分担研究報告書

救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究

分担課題：人工心肺による体外循環モデル作成と人工赤血球による充填効果

主任研究者 四津 良平 慶應義塾大学医学部 外科 教授
分担研究者 饗庭 了 慶應義塾大学医学部 外科 講師
山崎 真敬 慶應義塾大学医学部 外科 助手

研究要旨

人工赤血球を人工心肺回路充填液として使用することにより、極度の血液希釈状態における高次脳機能障害の防止効果が期待できる。平成 16 年度には、ラット人工心肺モデルを確立し、人工赤血球（Hb 小胞体）を充填して 90 分間運転し、その後脱管、覚醒させ、7 日間生存させた。神経学的認知試験として、迷路試験を実施した結果、対照群（リコンビナントアルブミン溶液充填）に比較して到達時間が有意に短く、高次脳機能障害が低減していた。これは、人工赤血球の充填により末梢組織への酸素運搬が保持された為と考えられ、人工赤血球の有用性が明らかになった。

A. 研究目的

現在、小児心臓外科の領域では体重 10 kg 以下の患者に対し、体外循環を使用する場合、人工心肺の充填液として濃厚赤血球（ACD ヘパリン血）を使用している。人工心肺の回路の充填液は約 300～400 ml 必要であり、晶質液で満たした場合、体重 10 kg 以下の患者（循環血液量は約 800 ml 程度）では、血液希釈（hrmodilution）が起き、酸素運搬体である赤血球の相対的な減少のため、組織酸素代謝に破綻を来す。

この為、現在、体重 10 kg 以下の患者に体外循環を行う場合は、輸血は避けられない状況にある。しかし今日、同種血輸血による感染症、移植片対宿主反応、免疫抑制などの弊害が明らかにされており、同種血輸血を可能な限り回避するように努めなければならない。

この臨床上のジレンマの一解決手段として、我々は人工赤血球である Hb 小胞体に注目した。本研究では、人工赤血球を人工心肺充填液として使

用することにより、極度の血液希釈状態における高次脳機能障害の防止効果を検討することを目的とする。

B. 研究方法

ローラーポンプと小型の動物実験用膜型肺（試作品、充填量 60 ml）を用いて人工心肺回路を作成し、回路内に 5%リコンビナントアルブミンを充填した群（HSA 群）、同種血を充填した群、人工赤血球（Hb 小胞体）を充填した群（HbV 群）、偽手術群の計 4 群に分けて実験を行った。Hb 小胞体は 5%リコンビナントアルブミンに分散させ、Hb 濃度を 8.6 g/dL とした。体重 450 g 前後の SD ラットをセボフルレンにて全身麻酔し、14G 静脈留置針にて気管内挿管した。挿管後人工呼吸器管理とした。人工心肺のカニューレーションとして、脱血は経右内頸静脈的に右房から、送血は尾動脈を介して行った。胸骨正中切開は行わなかった。右内頸静脈に挿管する際、ラットの右頸部に切開を加えるが、

皮切線はわずかで動物への負担を最小にするように配慮した。人工心肺の運転は常温下、無拍動送血法で 200 ml/kg/min の流量で 90 分間行った。

人工心肺運転終了後は人工心肺回路内の残存自己血液を 20 分間かけて血管内に戻した。その後、カニューレを抜き、麻酔から覚醒させたのち、動物をゲージにて飼育した。術後 1、3、5、7 日目に標準化神経学的認知試験及び迷路試験を行った。術後 7 日目に動物は犠牲死させ、脳の組織を採取し、海馬部の病理学検査を行った。

平成 16 年度は、ラット人工心肺モデルの最終的な予備実験をすすめるとともに、標準化神経学的認知試験、迷路試験、病理学的検査の評価を実施した。迷路試験は一般的な water maze test に従い、水槽内に水面より 3 cm 低い位置で島を作成し、4 箇所スタート地点から島にたどり着くまでの到達時間を計測した。そしてその合計を測定値とした。この測定は術後 1、3、5、7 日目にを行った。病理学的評価は脳の海馬 (CA1) を HE 染色し、変性を起こした神経細胞数を数えた。

C. 結果

平成 16 年度前半は人工心肺回路の確立に向け、予備実験を重ねた。当初、予定された流量 (100~150 ml/kg/min) での運転は、脱血不良にて困難であった。しかし脱血管の改良や、挿入方法の工夫、

またポンプの流量設定の変更などにより最終的には 200 ml/kg/min の流量を得るに至った。これにより人工心肺運転中は呼吸を完全に停止することが可能となり、実際の人工心肺と極めて近似した環境が得られるようになった。ただし、同種血輸血の群は生存例を得ることが困難であったので、ヘパリン以外に ACD などを試してみたが、期待されていた結果が得られなかった。

平成 16 年度後半は迷路試験、病理学的検査の評価を実施した。図 1 に人工心肺離脱後の迷路試験結果を示す。rHSA の群 (n=5) と HbV 充填の群 (n=9) との重複測定一分散分析法の結果、有意確率は 0.083 で交互作用を認めなかった。

そこで、rHSA の群 (n=5) と HbV 群 (n=9) に関して、それぞれ一変量の分散分析を行った。その結果、シェフェの多重比較で前者はいずれの測定日においても有意な変化はなかったが、後者はそれぞれの測定日で有意に到達時間が短縮された。またそれぞれの測定日に関してスチューデントの *t* 検定を行ったところ、7 日目に有意な差が生じていることがわかった ($p=0.045$)。

病理学的な評価に関しては各群で神経細胞数に有意差を認めなかった。

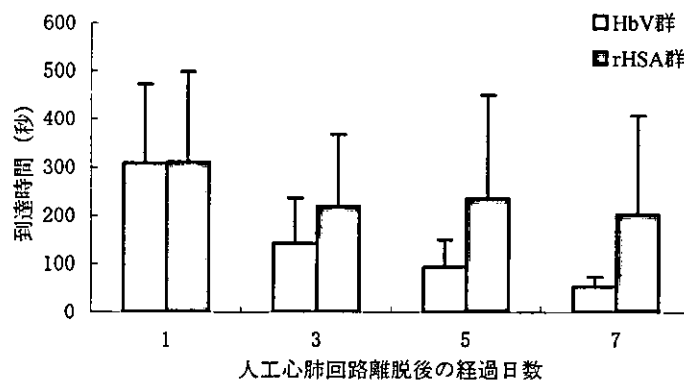


Fig. 1 迷路試験の成績 (平均値±標準偏差)

D. 考察

同種血充填の群の生存が困難であることに関しては、同種血の採取法や保存方法、糖分の調整、免疫機能の関与など幾つかの要因が考えられ、今後も更なる検討が必要と考えられた。

rHSA 群 (n=5) と HbV 群(n=9)の重複測定一分散分析法では残念ながら交互作用を認めなかったが、これは n の不足による可能性が高い。シェフェの多重比較で検討してみると到達時間は HbV 群が有意に速くなっており、またそれぞれの測定日に関しておこなったスチューデントの t 検定でも、7 日目に平均値の差が生じていることから、rHSA 群に関しては高次脳機能障害が示唆されたと考えられた。

病理学的評価に関しては神経細胞の虚血性変化をとらえることは出来なかった。元来ラットは脳虚血に強く、また病理学的に著明な変化が生じるような状態ではおそらく術後早期にあきらかな精神運動活動の低下が認められると考えられたので、今回の結果はそれに沿うものと考えられた。

E. 結論

人工心肺回路の充填液に人工赤血球を用いる方法は、今回の実験結果から十分に実現可能であると考えられた。また人工赤血球の充填により得られる酸素運搬量の増大が、高次脳機能の障害を軽減させる可能性を示唆した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. 森光晴、饗庭 了、加藤木利行、四津良平.最近の小児心臓手術における治療戦略および術式. *体外循環*. 31、1-12 (2004)

2. 石田明、上村知恵、橋詰賢一、饗庭 了、加藤木利行、四津良平、半田誠. 血小板輸血後に敗血症性ショックを呈し、*Morganella morganii* 菌による輸血後感染症が強く示唆された 1 例. *日本輸血学会雑誌*. 50、726-9. (2004)

3. R. Aeba, R. Yozu, M. Morita, T. Matayoshi. Total cavopulmonary connection: Open anastomosis of an extracardiac conduit with vacuum-assisted venous drainage. *Ann Thorac Surg* (accepted for publication).

2. 学会発表

1. 饗庭 了、加藤木利行、森 光晴、井上慎也、安西 兼丈、吉武 明弘、岡本一真、山崎真敬¹、武田尚一郎、木村成卓、四津 良平。(シンポジウム) 修正大血管転位症の治療戦略. 機能的修復術後遠隔成績から見て Double Switch 手術の適応拡大は正当化されるか? / 第 34 回日本心臓血管外科学会学術総会 / 2004.2. / 福岡

2. 森 光晴、加藤木 利行、饗庭 了、安西兼丈、井上慎也、吉武明弘、岡本一真、山崎真敬、武田尚一郎、木村成卓、四津良平 / (会長要望演題) ファロー四徴症遠隔成績からみた術式の選択自己組織を用いた右室流出路再建法 —右室-肺動脈直接吻合法の遠隔成績— / 第 34 回日本心臓血管外科学会学術総会 / 2004.2. / 福岡

3. 饗庭 了、加藤木利行、森 光晴、井上慎也、安西 兼丈、吉武 明弘、岡本一真、山崎真敬、武田尚一郎、木村成卓、四津 良平 / (パネルディスカッション) 成人期に達した先天性心疾患。複雑先天性心疾患に対する右室流出路再建術 -40 年間の単一施設における経験と

遠隔成績- / 第 104 回日本外科学会定期学術集会 / 2004.4. / 大阪

4. 安西兼丈、加藤木利行、饗庭 了、山崎真敬、四津良平 / (パネルディスカッション) TCPC の遠隔成績 / 第 41 回日本小児外科学会総会 / 2004.6. / 大阪
5. 饗庭 了、加藤木利行、岡本一真、四津良平。 / Norwood 循環管理の real-time Qp/Qs monitoring – preliminary report- / 第 40 回日本小児循環器学会総会。学術集会 / 2004.7. / 東京
6. 岡本一真、饗庭 了、加藤木利行、四津良平 / (シンポジウム) 21 世紀の心筋疾患の診断と治療。小児慢性心不全に対する細胞移植治療の展望 / 第 40 回日本小児循環器学会総会。学術集会 / 2004.7. / 東京
7. 山崎真敬、饗庭 了、四津良平 / (シンポジウム) 血液代替物の臨床応用—どのような状態に適応されるか? 人工赤血球を用いた人工心肺充填液の feasibility test / 第 1 回日本血液代替物学会年次大会 / 2004.7. 札幌
8. 山崎真敬、饗庭 了、四津良平 / 人工赤血球を用いた人工心肺充填液の feasibility test / 第 42 回日本人工臓器学会大会 / 2004.10. / 東京
9. 饗庭 了、井上慎也、安西 兼丈、吉武 明弘、岡本一真、山崎真敬、鈴木 亮、武田尚一郎、木村成卓、四津 良平 / (パネルディスカッション) 複雑心奇形 (TOF を含む) に対する心内修復術後成人期における再手術の手術成績。Fallot 四徴症修復術後成人期患者における再手術の適応 — 単一施設における長期 (18 年以上) follow-up から / 第 56 回日本胸部外科学会総 / 2004.11. / 札幌
10. 安西 兼丈、饗庭 了、井上慎也、吉武 明弘、鈴木 亮、山崎真敬、武田尚一郎、木村成卓、四津 良平、又吉 徹 / ビデオ。順行性陰圧脱血の補助を用いた心外導管 total cavopulmonary connection における“open”吻合法 / 第 56 回日本胸部外科学会総会 / 2004.11. / 札幌
11. T. Anzai, R. Aeba, K. Hotoda, O. Ishida, R. Yozu. / Long-term result of Fontan procedure. / The 21st Congress of Pan-pacific Surgical Association, Japan Chapter. / 2004.11. / Cairns, Australia
12. R. Yozu, R. Aeba, M. Yamazaki, A. Yoshitake / (Poster) Use of hemoglobin vesicles for cardiopulmonary bypass prime is feasible and safe in a rat model. / The 21st Congress of Pan-pacific Surgical Association, Japan Chapter. / 2004.11. / Cairns, Australia
13. K. Okamoto, R. Aeba, R. Yozu. / (Poster.) Expectation of mesenchymal stem cells in cell transplantation therapy for severe heart failure. / The 21st Congress of Pan-pacific Surgical Association, Japan Chapter. / 2004.11. / Cairns, Australia
14. 山崎真敬、饗庭 了、四津良平。 / (示説) 人工赤血球を用いた人工心肺充填液の feasibility test / 第 35 回日本心臓血管外科学会 / 2005.2. / 東京

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の開発に関する研究

分担課題：ビーグル犬における出血性ショックモデルを用いた
アルブミン-ヘムの酸素運搬に関する研究

分担研究者	相川 直樹	慶應義塾大学医学部	救急医学	教授
研究協力者	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部	外科	講師
	山本 学	慶應義塾大学医学部	外科	助手
	山本 尚志	ニプロ(株)医薬品研究所		
	黄 宇彬	早稲田大学理工学総合研究センター		講師
	中川 晶人	早稲田大学理工学総合研究センター		助手

研究要旨

人工赤血球として開発されたアルブミン-ヘムの脱血ショックに置ける酸素運搬を中心に蘇生効果について検討するため、中動物を用い、酸素運搬量、酸素消費量について検討した。アルブミン-ヘムは遺伝子組み換え技術を用いて製造された血漿タンパク成分に人工合成のヘムを包接させた人工赤血球である。アルブミン-ヘムにより酸素運搬が *in vivo* で行なわれていることは小動物において確認されているが、生体内でどの程度の酸素運搬が行われているかについては混合静脈血の採取が困難な小動物では検討が困難であった。5%リコンビナントヒトアルブミン生食による 75%血液希釈を行なって Native な赤血球による酸素運搬を減少させた状態で脱血ショックとし、ショック状態においてアルブミン-ヘムが生体内で酸素運搬を担っていることを中動物で検討した。対照群として蘇生液に Lactate Ringer 溶液、5%リコンビナントヒトアルブミン生食を用いた。その結果、Lactate Ringer 溶液では酸素代謝も循環動態の保持もできず、動物は死亡した。5%リコンビナントヒトアルブミン生食を用いて蘇生を行った群では生存率がまれであり、この群も心拍出量の低下に伴い、酸素運搬が低下し、死亡する動物を認めた。出血ショックに対して 5%リコンビナントヒトアルブミン生食による蘇生で生存した動物では混合静脈血酸素飽和度の減少が認められ、酸素消費はショック蘇生後安定していたことが明らかとなった。

アルブミン-ヘムは生体内で有効血中半減期が短いことが想定された。血漿中の鉄の測定から、半減期は 70 分、2 時間の経過でアルブミン-ヘムの 80% が血中から消失していた。今後は投与後の短い半減期に対応した投与方法を開発する必要があると考えられた。

A. 研究目的

出血性ショックにおいては循環動態を維持すると同時に各臓器、組織の Anoxic metabolism を改善する必要がある。臨床では輸血と酸素投与により

目的を達しているが、人工赤血球を投与することが可能であれば輸血に関する検査や副作用を回避することができる。アルブミン-ヘムは早稲田大学理工学総合研究センターにおいて開発された遺

伝子組み換え技術を用いて製造された血漿タンパク成分に人工合成のヘムを包接させた人工赤血球である。アルブミン-ヘムが生体内で酸素運搬を行い、循環動態に大きな影響を与えずに機能することを中動物を用いて検証することを目的とした。

B. 研究方法

雄性ビーグル犬 (6.1~7.4kg 月齢 5~10 ヶ月) を用い、ケタラルの基礎麻酔後に気管内挿管を行い、セボフルレン 2% の吸入麻酔により全身麻酔とした。呼吸は自発換気とした。

右前肢に薬剤投与用の静脈ラインを、右大腿静脈より Swan Ganz カテーテルを肺動脈まで挿入し、右大腿動脈に血圧監視用の動脈ラインを、左大腿動脈に脱血用および採血の動脈ラインを挿入した。実験に先立ってまず腹部正中切開を行ない、脾摘を施行した。犬では、出血性ショック時に脾臓が収縮することにより出血性ショックの状況を緩和する体内貯蔵庫として機能することが知られており、脾臓の影響を取り除くために前もって脾摘を行なった。

脾摘と同時に左腎皮質に Polarography 法による組織酸素分圧測定用の針電極を刺入した。前額部および腹部に近赤外分光法による組織内酸素飽和度測定用のソマセンサーを貼付した。脾摘後状態が安定した後に推定循環血液量の 75% を、5% リコンビナントヒトアルブミン生食溶液にて置換し、血液希釈モデルを作成した。血液希釈 30 分後に推定循環血液量の 30% を脱血し、30 分間ショック状態を保持した後蘇生液を用いてショック蘇生を行った。蘇生液としては Lactate Ringer 溶液 (LR 群 1 頭)、5% リコンビナントヒトアルブミン生食 (5% rHSA 群 3 頭)、アルブミン-ヘム生食溶液 (rHSA-heme 群 3 頭) を用い、蘇生液の投与量は脱血した血液量と等量とした。

処置後、血液希釈後、脱血前、脱血直後、脱血後 30 分、蘇生後、経時的に (直後、30、60、90、120、180、240 分後) に酸素代謝に関する諸標 (動脈血血液ガス、

混合静脈血血液ガス、腎皮質組織酸素分圧、脳組織内酸素飽和度、腹直筋内組織酸素飽和度) および循環動態を表す諸標について計測した。

また、経時的に採血を行い、末梢血検査を行なった。なお、本実験に用いた 5% アルブミン-ヘム生食溶液は、酸素運搬能としては 6 g/dl の濃度の Hb を含む血液と同等と考えられている。

倫理的配慮：実験プロトコールは慶應義塾大学医学部実験動物センターおよび動物実験委員会の承認を得て行なわれ、実験動物に関しては、十分な麻酔下にて実験を試行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

C. 結果

生存

Lactate Ringer 溶液で蘇生をした動物は蘇生液投与中は血圧の上昇が認められたが、蘇生液投与終了後速やかに血圧と心拍の低下を認め、20 分以内に死亡した。5% rHSA で蘇生した群ではショック状態から回復するものの血圧は徐々に低下し、3 頭中 2 頭は 30 分以内に死亡した。これに比し、rHSA-heme 群では 3 頭すべてで血圧が回復し、ショック状態を脱し、観察期間中、循環動態は安定していた。

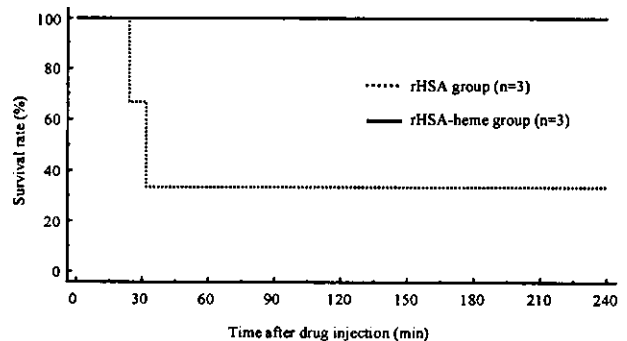


Fig. 1. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on survival rate in anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage.

ショックに対する蘇生効果

前述のように、ショック蘇生後 LR 群では収縮期圧が 90 mmHg を越えることはなく、ショック状態から脱しきれずに心拍出量、心拍数が急速に減少し、心停止に至った。rHSA 群でも 3 頭中 1 頭を除きショック状態から回復することなく死亡した。生存した動物では血圧は保たれていた。

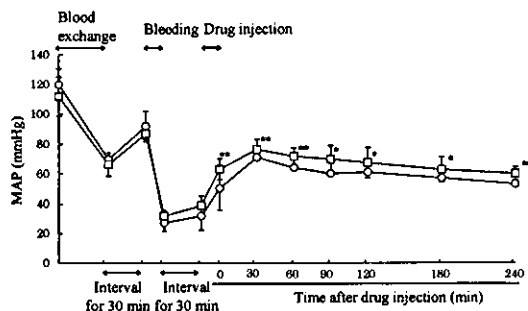


Fig. 2. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on mean arterial pressure (MAP). Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs (\circ ; rHSA group and \square ; rHSA-heme group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. before drug injection of rHSA-heme group (Paired t-test).

呼吸数

呼吸数は脱血ショックにより頻呼吸となり、 43.7 ± 14.6 /min であったが蘇生直後に 61.7 ± 13.3 /min に上昇した。その後徐々に減少し、240 分後では 44.0 ± 12.3 /min であった。rHSA 群の中で生存した動物では蘇生後呼吸数の一時的な増加を認め (25.3 /min から 37.0 /min)、その後も呼吸数は上昇したが、90 分後に最大値 46 /min を呈した後減少し、240 分後は 35 /min であった。

動脈血血液ガス、混合静脈血血液ガス

動脈血血液ガスの変化を検討すると、 pO_2 , pCO_2 に関しては rHSA 群、rHSA-heme 群ともに大きな変化はなく、出血後の頻呼吸のため、 pO_2 の上昇、 pCO_2 の低下を認めたが、蘇生後生存した動物では正常範囲内で推移し、両群間で大きな違いはなかった。

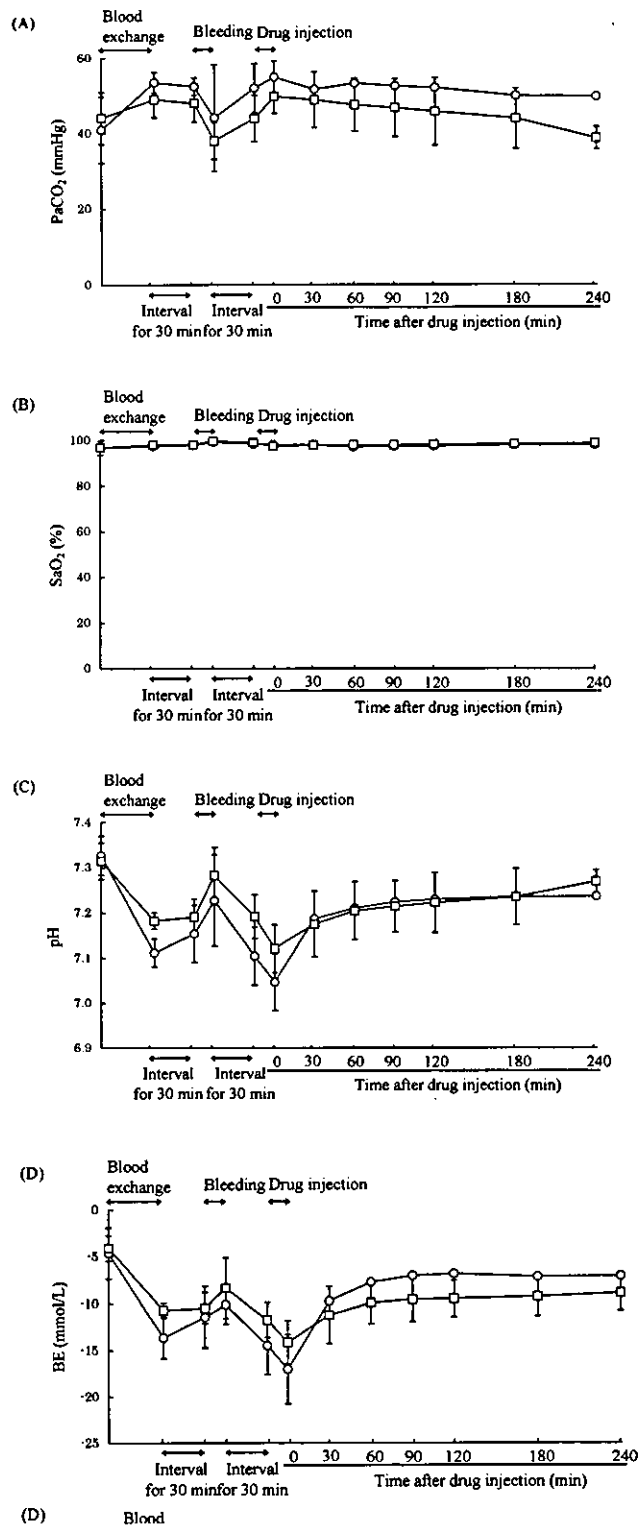


Fig. 3. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on arterial blood CO_2 -tension ($PaCO_2$) (A), arterial blood O_2 -saturation (SaO_2) (B), blood pH (C), base excess (BE) (D), in anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs (\circ ; rHSA group and \square ; rHSA-heme group).

pHは血液希釈により減少し、脱血性ショックによって一時的に上昇したが、ショック状態の継続と共にアシドーシスが進んだ。蘇生後は緩やかに回復した。

Base Excess (BE) は脱血ショックによって低下を認めたが、蘇生液投与により上昇し、投与 240 分後では rHSA-heme 群では -8.83 ± 1.84 であった。rHSA 群で生存した動物でも同様の経過を示し、組成 240 分後では -7.0 であった。

PvO₂の推移では血液希釈により rHSA-heme 群では 52.17 ± 4.86 mmHg から 44.1 ± 5.3 mmHg に低下し、出血ショックにより 25.77 ± 9.12 mmHg 間でさらに低下した。そのアルブミン-ヘムの投与により 33.57 ± 6.6 mmHg に回復した後、徐々に減少し、240 分後では 23.03 ± 5.85 mmHg となった。rHSA 群で生存した動物では rHSA-heme 群とほとんど変化のない経過を示した。

動脈血酸素飽和度は実験期間中 96%以上で経過し、安定していた。一方、混合静脈血酸素飽和度は血液希釈により 77.91 ± 5.70 %から 67.19 ± 8.14 %に若干低下した。脱血ショックにより 32.29 ± 18.93 %まで低下した。rHSA-heme 群ではアルブミン-ヘムの投与により SvO₂ は 48.24 ± 12.93 %まで回復し、その後徐々に減少した。生存した rHSA 群の動物でもほぼ同様の経過を示していた。

組織酸素飽和度および組織内酸素分圧

腎皮質組織酸素飽和度については血液希釈前に 30.0 ± 6.9 mmHg であったが、血液希釈により 20.0 ± 2.6 mmHg に減少し、さらに脱血ショックにより 16.0 ± 3.5 mmHg まで低下した。rHSA-heme 群では蘇生直後 18.0 ± 4.4 mmHg に上昇したが、その後一時的な低値を認めた後緩徐に上昇し、240 分後には 22.0 ± 5.0 mmHg まで回復した。

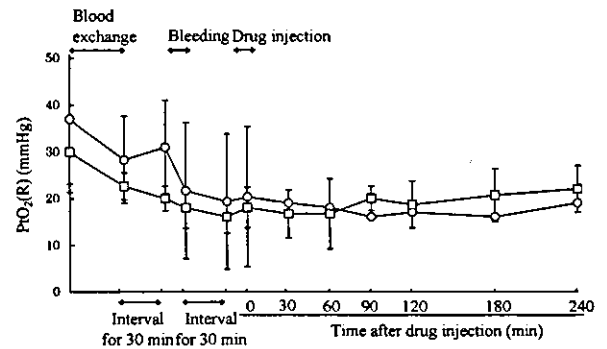


Fig. 4. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on renal cortex O₂-tension (PtO₂(R)) of anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs (\circ ; rHSA group and \square ; rHSA-heme group).

脳内組織酸素飽和度の変化は rHSA-heme 群では脱血ショックにより 60%から 41.7%に低下したが、ショック蘇生後 49.7%まで上昇し、その後は安定した経過をたどった。しかし、ショック前値には回復しなかった。rHSA 群で生存した動物では蘇生後一時的に脳組織内酸素飽和度の上昇を認めたが、ショック後時間の経過とともに低下し、240 分後には 26%まで低下していた。

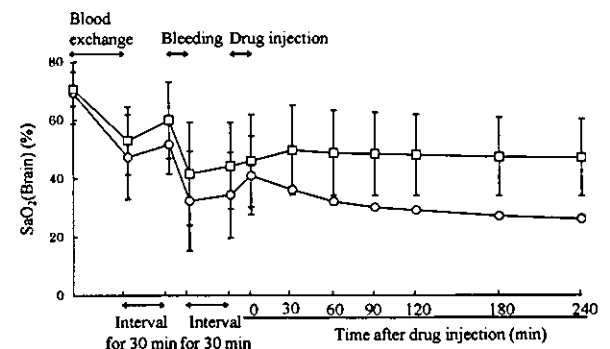


Fig. 5. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on brain O₂-saturation (StO₂(B)) of anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs (\circ ; rHSA group and \square ; rHSA-heme group).

腹直筋組織酸素飽和度は血液希釈前に $74.3 \pm 3.2\%$ 、血液希釈後 $58.0 \pm 2.6\%$ 、脱血ショック後 $45.0 \pm 2.0\%$ であった。rHSA-heme 群ではアルブミン-ヘム投与により上昇し、 43.3% から 46.3% の間で推移し、安定していたが、血液希釈後の値には回復しなかった。

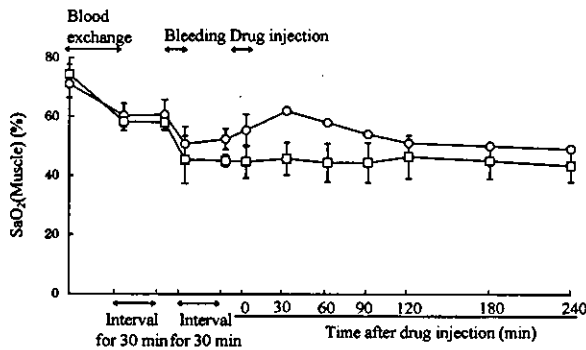


Fig. 6. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on rectus abdominis O_2 -saturation ($StO_2(M)$) of anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs (\circ ; rHSA group and \square ; rHSA-heme group).

血漿中アルブミン-ヘムの推移

経時的に採取した血液の血漿成分の中の鉄濃度を測定することによってアルブミン-ヘムの血液内での消長を測定した。アルブミン投与直後では $604.99 \pm 55.13 \mu M$ であったが一相性の減衰パターンを示し、投与 120 分後には $178.75 \mu M$ に減少した。このアルブミン-ヘムのメト化率を測定したところ投与直後は 5.4 % であったがその後徐々に上昇し、120 分後には 9.9 % となった。

酸素運搬、酸素消費

得られた動脈血酸素飽和度、混合静脈血酸素飽和度、心拍出量、赤血球の Hb 濃度、アルブミン-ヘム濃度メト化率より酸素運搬量、酸素消費量を計算で求めた。その結果、血液希釈後 133.9 ± 26.45 、 $6.3 \pm 20.2 \text{ ml/min}$ の酸素運搬が行なわれていたが、脱

血ショックにより $56.3 \pm 20.2 \text{ ml/min}$ まで低下した。rHSA-heme 群では蘇生 30 分後に $134.0 \pm 45.2 \text{ ml/min}$ に上昇し、その後徐々に酸素運搬が低下し、240 分後では $117.1 \pm 37.7 \text{ ml/min}$ となった。rHSA 群は、生存した動物では蘇生 30 分後に 107.8 ml/min まで回復したが、急激に低下し、240 分後は 60.5 ml/min となった。

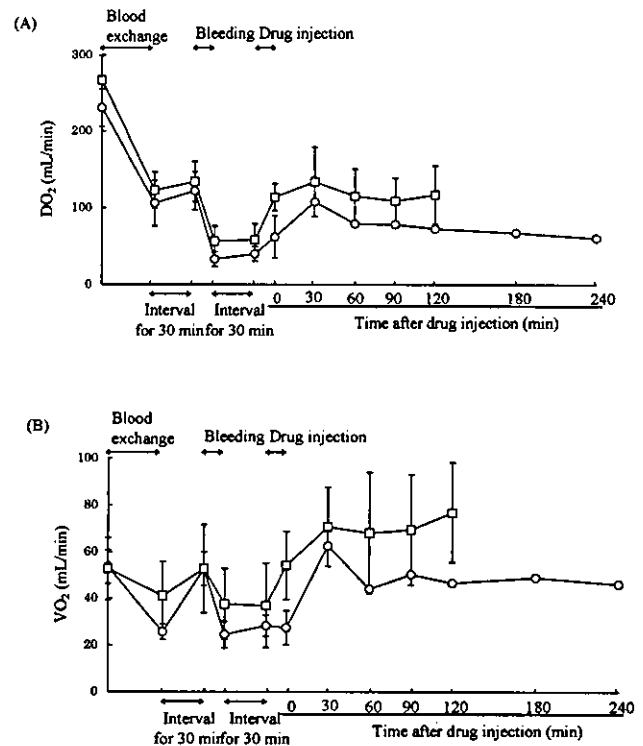


Fig. 7. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on oxygen delivery (DO_2) (A), oxygen consumption (VO_2) (B) in anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs (\circ ; rHSA group and \square ; rHSA-heme group).

酸素消費を検討すると rHSA-heme 群では $52.7 \pm 13.3 \text{ ml/min}$ からショック直後には $37.5 \pm 15.2 \text{ ml/min}$ まで低下したが、蘇生 30 分後には $70.7 \pm 16.9 \text{ ml/min}$ まで上昇し、以後安定して推移した。アルブミン-ヘムによる酸素運搬を計算で求めると、投与直後は 24.5 % の酸素を運搬していたが、アル

ブミン-ヘムの血中からの消失に伴い 120 分後には 6.5 %を運搬していることとなった。一方酸素消費に対するアルブミン-ヘムの貢献度も投与直後は 15.6%であったが、投与 120 分後では 4.3 %まで減少した。

D. 考察

アルブミン-ヘムが中動物の脱血ショックモデルにて安全にしかも有効なショック蘇生液として機能することが明らかとなった。比較する対照群として蘇生液に Lactate Ringer 溶液あるいは 5%リコンビナントヒトアルブミン生食を用いた。その結果、ショック時間は生存していたが、これらの蘇生液を用いて蘇生を行っても一時的な血圧の上昇を認めるのみで蘇生 30 分以内に血圧の維持が困難となり、死亡するに至った。アルブミン-ヘム投与群では全例ショック状態から脱し、実験期間中良好な経過を示した。

ガス交換および酸素運搬と消費について検討すると、ガス交換については rHSA 群、rHSA-heme 群ともに安定していた。組織の嫌気代謝を反映する pH、および BE に関してはアシドーシスが進み、BE が減少したが、蘇生液投与により改善が認められた。このことはアルブミン-ヘムが血圧の維持だけでなく、組織の酸素代謝を改善する効果があることを示していると考えられた。混合静脈血液ガスではショック蘇生後すみやかに PvO₂ が改善した。これも、血圧の上昇に加え、アルブミン-ヘムによる酸素運搬が関与していることが考えられた。また、蘇生後上昇した PvO₂ は経時的に減少し、アルブミン-ヘムが血中より消失していることが推測された。

組織内の酸素分圧および組織中酸素飽和度を異なった方法で腎、脳、筋肉と 3 箇所計測した。rHSA-heme 群ではショック蘇生後組織酸素分圧の上昇を認め、状態の安定に伴って徐々に上昇した。これはアルブミン-ヘムの酸素運搬能に加えてショックによる循環不全の状態が改善され、臓器緩

急が改善したためであると考えられた。一方、脳組織内酸素飽和度、および腹直筋酸素飽和度はショック蘇生後上昇を認めたが、経時的に低下傾向を示した。これは、計測する目標が組織内の血流中の Hb をターゲットとしているためと思われた。

アルブミン-ヘムは投与後の半減期が短いことが小動物に投与した結果から予測されていた。今回の実験では血漿中の鉄濃度を計測することにより酸素運搬にどの程度貢献しているかについて計算によって検討した。投与したアルブミン-ヘム溶液は血液に換算すると Hb 濃度が 6g の洗浄赤血球と同等の酸素運搬能を有していると考えられる。今回のショックの実験系で、アルブミン-ヘムは蘇生直後は 24%以上の酸素を運搬し、酸素消費の 15.6%がアルブミン-ヘム由来の酸素でまかなわれていたが、120 分後には酸素運搬の 6.5%、酸素消費の 4.3%をまかなうに留まった。この事実から、ショック蘇生においては急性期に組織、臓器の血流と酸素代謝を改善することにより、ショック状態を離脱し、定常状態を作ることが重要であることが再確認され、この目的でアルブミン-ヘムを使用することに意義があると考えられた。

E. 結論

ビーグル犬を用いて 75 %の血液希釈後に 30 %の循環血液量を脱血し、ショックを作成、アルブミン-ヘムの蘇生効果を酸素運搬の面から検討した。その結果、アルブミン-ヘムはショック蘇生において酸素運搬を改善するとともに組織の酸素代謝を改善することが明らかとなり、出血性ショックの急性期に使用するのに適切な蘇生液となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. M.R. Lewin, S. Hori, N. Aikawa. Emergency medical services in Japan: an opportunity for the rational development of pre-hospital care and research. *J Emerg. Med.* **28**, 237-241 (2005)
2. 栗原智宏、藤島清太郎、相川直樹. SIRS・sepsis の重症度評価. *日本臨床.* **62**, 2291-2295 (2004)
3. 相川直樹、藤島清太郎. 序 : SIRS, sepsis, 敗血症ノ病態解明と sepsis に対する新規治療法の開発. *日本臨床.* **62**, 2173-2176 (2004)
4. 藤島清太郎、相川直樹. 高サイトカイン血症の病態生理. *日本臨床.* **62**, 2166-2171 (2004).
5. M. Suzuki, S. Hori, I. Nakamura, K. Soejima, N.

Aikawa. Long-term survival of Japanese patients transported to an emergency department because of syncope. *Ann. Emerg. Med.* **44**, 215-221 (2004)

6. K. Sekine, S. Fujishima, N. Aikawa. Plasma hepatocyte growth factor is increased in early-phase sepsis. *J. Infect. Chemother.* **10**, 110-114 (2004)

2. 学会発表

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： 1. Hb 小胞体の体内酸素放出挙動の解析
2. メトヘモグロビン/L-Tyrosine による過酸化水素消去系を利用した Hb 小胞体のメト化抑制
3. アルブミン-ヘムの物理化学的特徴
4. 人工赤血球用バッグの開発に関する検討

分担研究者	小松 晃之	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
	武岡 真司	早稲田大学 理工学術院 助教授
	酒井 宏水	早稲田大学 理総研 助教授
	宗 慶太郎	早稲田大学 理総研 講師
	黄 宇彬	早稲田大学 理総研 講師
	中川 晶人	早稲田大学 理総研 助手
	王 榮民	早稲田大学 理総研 訪問教授

研究要旨

(1) Hb 小胞体投与後に細動脈血流を停止させ、酸素含量の変動を解析したところ、高酸素親和度の Hb 小胞体は酸素を徐放し、僅かな投与量でも低酸素領域では赤血球を上回る酸素供給源として機能した。(2) (メト Hb/L-Tyr) 内包 Hb 小胞体は、*in vivo* でも H_2O_2 に起因する Hb の met 化を抑制する効果を有する。(3) 合成の容易な $\alpha^3\beta$ 置換型ヘムを包接したアルブミン-ヘムを新規に調製し、その可逆的酸素結合を確認した。(4) 既存の製剤用バッグ仕様や関連法規等の調査の結果、更に救急医療現場の臨床医の意見を総合し、要求される人工赤血球用バッグの要点が明確となった。

1. Hb 小胞体の体内酸素放出挙動の解析

A. 研究目的

低酸素状態に陥った組織に対し、修飾 Hb 溶液の投与が酸素化に有効であることが多数報告されているが、Hb 小胞体も有茎皮弁の虚血領域の酸素化に有効であることが Emi ら (Inselspital Univ. Hospital, Bern) と早稲田の共同研究により明らかにされた (Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003;285: H1140-H1147)。そこで本研究では、低酸素領域に効率的に酸素を供給するための条件を検

討することを目的とし、今回は Hb 小胞体投与後に、細動脈の血流を停止させた後の酸素分圧の変動から、Hb 小胞体の *in vivo* における酸素放出挙動を明らかにすることを目的とした。本研究は、Prof. Intaglietta (Dept. Bioeng., Univ. California, San Diego) と早大の共同研究として実施した。

B. 研究方法

Hamster dorsal skinfold window model を利用し、皮下微小循環を観測部位とした。血管内酸素分圧