

Fig. 6. Fe concentration in plasma after injection of rHSA-heme to dogs. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs.

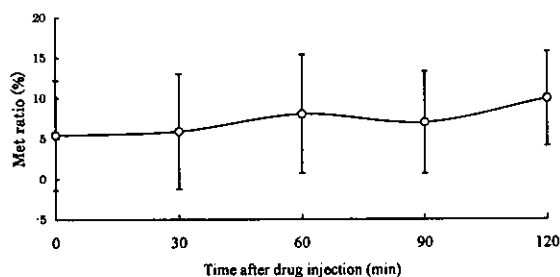


Fig. 7. Met ratio after injection of rHSA-heme to dogs. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs.

D. 考察

アルブミン-ヘム溶液を蘇生に用いたときには死亡例を認めなかったが、Lactate Ringer 溶液では1例が死亡し、リコンビナントヒトアルブミン生食では3頭中2頭に死亡を認めており、アルブミン-ヘムは血液希釈後の出血性ショックモデルにおいてすぐれた蘇生効果を呈した。

人工血液による出血性ショックの蘇生について評価を行なう際、修飾 Hb では分子状の人工酸素運搬体が血管壁より漏出あるいは血管壁に近い部分を流れるために一酸化窒素 (NO) を吸着し、抵抗血管を収縮させるため、血管抵抗が上昇し、血圧を保持すると考えられている。アルブミン-ヘムも修飾 Hb 同様分子状の人工酸素運搬体であるため、同じ現象が起こるのではないかと考えられていた。

しかし、体血管抵抗に関してはアルブミン-ヘムを投与後に著しい上昇を認めることはなかった。

肺動脈圧はアルブミン-ヘム投与直後に上昇し

たが、これはアルブミン投与によっても同様に上昇しており、ショック蘇生時の特徴的な所見と考えるとよいと思われた。また、肺血管抵抗値として検討すると、脱血前値に比して有意に高い値であったが、血液希釈前値に比べると明らかに低い値であり、アルブミン-ヘムが NO を吸着して血管を収縮させるということは考え難い。これは、修飾 Hb を用いた人工赤血球の欠点を持たない点で有利であり、また、修飾 Hb による血管収縮の機序を明らかにする手段となると考えられた。

今回のモデルでは、ショック蘇生後の Native な赤血球由来の Hb は血液希釈後 3.2 g/dl、脱血ショック後には 2.8 g/dl と非常に低い値となり、生体が機能するために必要な Hb 濃度の限界であると考えられた。このため、循環動態を安定させるために投与したアルブミン溶液のみでは生体の恒常性を維持することができず、死亡する動物が出現した。然るにアルブミン-ヘムでは循環動態を保持すると同時に酸素運搬も行なうため、生体の恒常性を維持することができたと考えられる。

投与したアルブミン-ヘムの代謝であるが、ヘムに限ってその代謝を調べたところ、一相性に血中より消失することが明らかとなり、酵素反応や代謝によらない物理的な分散によって血中から消失している可能性が示唆された。メト化についても経時的に上昇しており、今後臨床での利用法について考慮する必要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-ヘムの蘇生効果を循環動態、血液生化学、病理学的な面から検討した。その結果、アルブミン-ヘムはアルブミン生食に比し、すぐれたショック蘇生効果を表し、血液生化学的検査においても明らかな毒性を表さなかった。出血性ショックの蘇生液として有効に利用できる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

1. 論文発表

1. Y. Huang, T. Komatsu, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Safety evaluation of an artificial O₂ carrier as a red blood cell substitute by blood biochemical tests and histopathology observations. *ASAIO J.* **50**, 525-529 (2004)
2. T. Komatsu, H. Yamamoto, Y. Huang, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein "albumin-heme" into an acute anemia rat model after seventy-percent hemodilution. *J. Biomed. Mater. Res.* **71A**, 644-651 (2004)
3. A. Yoshizu, Y. Izumi, S. Park, H. Sakai, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Ikeda, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicle, maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor-alpha. *ASAIO J.* **50**, 458-463 (2004)
4. Y. Huang, T. Komatsu, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Exchange transfusion with entirely synthetic red-cell substitute albumin-heme into rats: physiological responses and blood biochemical tests. *J. Biomed. Mater. Res A.* **71A**, 63-69 (2004)
5. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, E. Ikeda, K. Sou, S. Takeoka, M. Suematsu, M. Takaori, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **311**, 874-884 (2004)
6. H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, E. Ikeda, 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**, 4317-4325 (2004)
7. 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: *Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line*, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 1-21, Eds. by K. Kobayashi, E. Tsuchida, and H. Horinouchi. Springer-Verlag Tokyo (2005).
8. T. Komatsu, Y. Huang, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. "Albumin-Heme: A Synthetic Heme-Based Oxygen Carrier" In "*Blood Substitutes*" (Ed. By Robert M. Winslow, Elsevier), (2005) in press.

2. 学会発表

1. E. Tsuchida, H. Sakai, H. Horinouchi, S. Takeoka, K. Kobayashi. / Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. / The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan
2. 堀之内宏久、小林紘一、渡辺真純、泉陽太郎、山本学、藤本博行、土田英俊、武岡真司、酒井宏水、小松晃之、山本尚志／人工酸素運搬体の

開発／第 52 回日本輸血学会総会／2004. 6.23-25
／札幌コンベンションセンター

林紘一、土田英俊／人工赤血球(ヘモグロビン小
胞体)による 40%血液交換後の回復過程／第 42
回日本人工臓器学会大会／2004.10.5-7／東京

3. 酒井宏水、堀之内宏久、武岡真司、小林紘一、
土田英俊／ヘモグロビン小胞体による 40%血液
交換後の回復過程／第 11 回日本血液代替物学会
／2004.7.13-14／札幌市

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし

4. 酒井宏水、山本学、堀之内宏久、武岡真司、小

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：人工赤血球の脳虚血領域に及ぼす影響：慢性モデルでの検討

分担研究者 外 須美夫 北里大学麻酔科学教室 教授

研究協力者 岡本 浩嗣 北里大学麻酔科学教室 助教授

中野 貴明 北里大学麻酔科学教室

研究要旨

人工赤血球の投与による脳虚血領域に及ぼす影響を検討している。平成16年度は、慢性脳梗塞モデルを作製し、Hb小胞体による血液置換を実施し、2日後の脳梗塞或を組織病理学的に検討した。Hb小胞体では、脳梗塞或を縮小させる明確な効果は認められなかった。今後は人工赤血球の物性値の改良、血中の機能半減期を考慮した観察を実施し、効果のみられる条件を探索する予定である。

A. 研究目的

人工赤血球は緊急時の出血に際し、長期備蓄に耐える安全で血液型が無く、何時でも何処でも迅速に供給できる酸素運搬体として期待されている。また、人工赤血球は赤血球よりも小粒径で粘度も低いことから、体組織や臓器の酸素化に有効で術前の血液希釈液や体外循環や移植を含めた臓器保存灌流液あるいは梗塞部位への酸素供給液、癌治療薬、組織再生のための細胞培養液など多用途に応用される可能性がある。我々は、人工赤血球の脳梗塞領域への影響を検討し、これまでに、脳虚血の急性ラットモデルにおいてはアルブミン投与と比較して人工赤血球（Hb小胞体）の投与でやや梗塞領域の減少を認めた（15年度報告）。そこで、16年度は慢性モデルでの検討が必要と考え、慢性脳梗塞モデルラットで研究を実施した。

B. 研究方法

雄性SDラット（350～400g）に基礎麻酔としてペントバルビタール50 mg/kgの腹腔内投与を行った。気管挿管後、人工呼吸とし、呼吸炭酸ガス濃度（PETCO₂）を30～35 mmHgに維持した。大腿動静脈にカテーテルを留置した。血液置換をラットあたり10mlづつ行った。Hb小胞体を5%アルブミン溶液に分散させた溶液（[Hb]=8.6 g/dL）で同量置換した群（Hb小胞体群、n=12）と、対照として空の小胞体で置換した群（ContV群、n=3）の2群に分けた。循環動態が安定したところで、総頸動脈より挿入した内腔閉塞用の糸を用いて左中大脳動脈を一過性に閉塞した。2時間後に再灌流し、覚醒させ2日目に断頭した。脳梗塞出現組織はホルマリン固定後、後日HE染色で組織の梗塞域を測定した。

C. 結果

血液置換後の両群の血液検査データを表に示す。

表1 血液置換前後の血液検査結果

		Hb小胞 体	contV
Ht (%)	before	45	47.7
	after	25.7	24.8
PH	before	7.402	7.458
	after	7.342	7.380
BE (mmol/l)	before	0.8	2.1
	after	-2.5	-1.5
PaO ₂ (mmHg)	before	84.4	91.6
	after	67.1	84.5
PaCO ₂ (mmHg)	before	41.2	36.7
	after	42.3	39.3
Blood sugar (mg/dl)		119	127
BW (g)		320~400	370~400

血液置換により、ヘマトクリット (Ht) は両群とも、45前後から25前後に低下した。これらの血液データに両群で有意差は認められなかった。また、平均動脈血圧に差は認められなかった。しかし、脳梗塞領域はHb小胞体の梗塞領域が21.1%、ContV群が10.4%であった。

D. 考察

急性脳虚血モデルでは、脳梗塞範囲はHb小胞体群で小さい傾向が認められたが、今回の慢性梗塞モデルでは、Hb小胞体群の効果はみられなかった。その理由は明らかではないが、対照群の数がn=3と小さくまだ十分な比較ができていない。また、脳梗塞の規模によっては週間生存の可能性が低くなり、梗塞巣の確認が困難となる可能性もあり、今後、週間生存実験として梗塞領域の確認が必要と思われる。更に、Hb小胞体による置換は空小胞体より脳梗塞領域が増加するとすれば、物性値を改良した人工赤血球を用いた実験や、血中の機能半減期を考慮した観察を実施し、効果のみられる条件を探索する実験も

必要かと思われる。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. A. Kanai, A. Mori, A. Osawa, A. Suzuki and S. Hoka. Efficacy of oral pranlukast hydrate, a leukotriene receptor antagonist, in the treatment of postherpetic neuralgia. *The Pain Clinic.*, **16**, 389-392 (2004)
2. M. Sugimachi, H. Okamoto, S. Hoka and K. Sunagawa. Faster oscillometric manometry does not sacrifice the accuracy of blood pressure determination. *Blood Press Monit.* **9**, 135-141 (2004)
3. A. Ozawa, Y. Nara, H. Kimotsuki, E. Nakahara, H. Okamoto, S. Hoka. Migration of neutrophils elicited by leukotriene B4 is inhibited by fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in the microvasculature of hamster cheek pouch. *日本循環制御医学会雑誌*, **25**, 267-271 (2004)
4. K. Yamaura, S. Hoka, J. Yoshimura, S. Takahashi. Preoperative non-invasive assessment of stress response to breath-holding test. *日本循環制御医学会雑誌*, **25**, 272-275 (2004)
5. 丸山美由紀、岡本浩嗣、諏訪潤子、麻生俊英、外須美夫. 超早期抜管を行う fast track pediatric cardiac surgery における bispectral index (BIS) monitor の有用性. *麻酔*, **53**, 630-633 (2004)
6. 小澤章子、外須美夫. 外傷性大量出血による周術期心停止患者の生存率と男女差. *循環制御*, **25**, 246-249 (2004)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

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：1. ウサギ出血モデルにおける人工赤血球投与後の臓器酸素分圧と血管透過性の評価
2. 人工赤血球のヒト全血の凝固能に及ぼす影響

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

研究要旨

(1) ウサギ急性出血性ショックモデルを作成し、Fluid Resuscitation として出血量と等量の 5% リコンビナントヒトアルブミン (rHSA 群)、rHSA に分散した Hb 小胞体溶液 (HbV/rHSA 群)、等量と 3 倍量の乳酸リンゲル液 (LR 群) で行った。循環動態、血液ガス分析、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。LR 群は、一過性の循環改善効果が期待できたが、その後の血漿成分の血管外漏出と臓器や全身性の循環不全や低酸素性障害を認めた。HbV/rHSA 群は、早期より脳や腎臓の組織酸素分圧の改善を認めた。rHSA 群と HbV/rHSA 群には動脈圧の上昇に有意な差は認められなかった。HbV/rHSA 群は、酸素消費量が改善し、混合静脈血酸素飽和度の増加がみられた。

(2) 人工赤血球の血小板機能を含む凝固機能に与える影響を、健康人全血に対して in vitro でソノクロットを用いて評価した。健康ボランティア 7 人からの採血を、乳酸リンゲル液または生理食塩水に分散した Hb 小胞体溶液 ([Hb] = 10 g/dL, HbV 群) で、それぞれ 20%、40%、60%、80% に希釈した。SonACT や Clot Rate は 2 群間に有意な差は無かった。Hb 小胞体自体が血液凝固能に及ぼす影響はほとんど無く、大量出血時の輸液蘇生時にも従来の細胞外液補充液と同様に使用出来る可能性が高い。

1. ウサギ出血モデルにおける人工赤血球投与後の臓器酸素分圧と血管透過性の評価

A. 研究目的

細胞外液補充液は、出血に対して現在広く行われている輸液蘇生である。出血性ショックでは、ケミカルメディエーターを介する血管内皮の変化が生じる。この状態に対して、細胞外液補充液の大量投与は、血管外の漏出や血管内皮の膨化を来し、十分な末梢循環改善効果が期待できない

可能性がある。これに対し、膠質液による輸液蘇生法は、血管外への漏出を抑え、その後の血行動態を安定させる。しかし、酸素運搬の役割は殆ど無い。一方、人工赤血球は、血行動態や末梢血管抵抗および組織循環に与える影響、更には組織への酸素運搬について明らかにする必要がある。

本研究の目的は、出血性ショック時の輸液蘇生による効果を想定し、人工赤血球の蘇生効果と大量急速輸液による安全性を血行動態や臓器酸素

分圧、酸素消費量、血漿浸透圧変化を計測し、他の輸液剤による蘇生効果と比較検討することである。細胞外液補充液に比べ、非代償臓器の血流や酸素分圧の改善が期待できる。また、蘇生後の血管内循環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1.9-2.7 kg, 24匹 (n=6) を対象とした。ケタラル 10 mg/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 15 mg/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3 mm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。兎径部より動脈カテーテルを挿入し、観血的動脈圧モニターと採血・脱血に用いた。また、内頸静脈よりカテーテルを挿入し圧の測定と採血に用いた。大脳・肝臓・腎臓・Vastus lateralis musclesに酸素電極 (栄行科学社製) を挿入し組織酸素分圧の測定に用いた。血行動態が安定した後、動脈より血液ガス・浸透圧の為に0.5 ml採血し、耳静脈よりインドシアニングリーン (ICG) 1 mg (1 ml) を投与し、DDG Analyzerにて心係数と循環血液量を測定した。その後、平均血圧が30-35 mmHg (50%循環血液量相当) となるまで15分間で動脈より脱血した。脱血後30分間の安定期間の後に、同様に採血とICGの投与を行った。輸液蘇生として、脱血量と等量の乳酸リンゲル液 (LR群)、5%リコンビナントヒトアルブミン溶液 (rHSA群)、Hb小胞体/5%リコンビナントヒトアルブミン分散液 (HbV/rHSA群)、または、脱血量の3倍

量の乳酸リンゲル液 (3XLR群) を15分間で静脈投与した。蘇生直後、60分後、120分後に上記と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。

統計方法は、群内の変化をWilcoxonの符号付順検定で、群間の変化または変化率をMann-WhitneyのU検定で行った。危険率0.05未満を有意差ありとした。

C. 結果

各群における体重や、体重あたりの脱血量に有意差はなかった。乳酸リンゲル液を使用した群では、蘇生後しばらくして平均動脈圧や中心静脈圧、心係数は再度低下した。

混合静脈血酸素飽和度は、rHSA群とHbV/rHSA群で回復したが、酸素消費量はHbV/rHSA群でほぼ前値に回復していた。

脳や腎臓では、他の群と異なり、HbV/rHSA群で輸液蘇生直後より組織酸素分圧の改善がみられた。

晶質浸透圧は、この実験期間中での変化は僅かであった。膠質浸透圧は、出血性ショックにより低下し、RLによる輸液蘇生では、終始低下したままであった。一方、rHSA群とHbV/rHSA群で蘇生後より回復した。

D. 考察

我々の作成した出血性ショックモデルでは、ショックにより動脈血圧・中心静脈血圧・心拍出量の低下を示し、これに伴いBase Excessの低下と血中乳酸値の上昇を来した。混合静脈血酸素飽和度は低下し、酸素消費量も低下した。組織酸素分圧も随伴して低下した。これらは、蘇生により回復傾向を示した。特に、人工赤血球であるHb小

胞体の投与によりこれらの回復は速やかであり、酸素供給と酸素消費ともに改善され、更に心係数も改善された。これは、全身血管抵抗の増加による血圧上昇ではなく、心機能の早期改善に伴う末梢組織の酸素供給の改善であり、晶質液との比較はもとより、単純な膠質液による蘇生より付加的価値を期待出来るかもしれない。膠質液による蘇生後は、血漿膠質浸透圧が改善し、これが蘇生後2時間の安定した血行動態と好気性代謝維持に必要である一因子であることが示唆された。

E. 結論

乳酸リングル液の Fluid Resuscitation は、一過性の循環改善効果であり、出血量と同量の輸液蘇生では膠質液の方がその後の蘇生効果を維持出来る。さらに、Hb 小胞体の付加は、速やかな主要臓器の組織酸素利用の改善を伴う全身性の酸素消費量の改善をもたらし、末梢血流不全を伴わない可能性が高い。これは、出血性ショックにおける、更なる付加的価値が期待出来るかもしれない。

2. 人工赤血球のヒト全血の凝固能に及ぼす影響

A. 研究目的

出血性ショックに対する輸液蘇生は、投与量によっては凝固能に及ぼし、更にはプレホスピタルにおける生存率に反映する可能性がある。Hb 小胞体は血液型などの輸血前検査の必要としない人工赤血球の一つである。この Hb 小胞体溶液のヒト血液の血液凝固能に与える影響を *in vitro* で調査することを目的とした。

B. 研究方法

健康成人男性7人、年齢26-37歳、の全血を対

象とした。採血液について、血色素濃度、ヘマトクリット、血小板数、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT)、フィブリノーゲン濃度を測定した。また、連続する9時間で1時間置きに採血し、全血と希釈血液 (20%、40%、60%、80%希釈) について、ソノクロットアナライザー (サイエンコ社製、米国) にて全血凝固機能検査をおこなった。

また、乳酸リングル液による希釈の影響を、PT、aPTT、フィブリノーゲン濃度から推定した。希釈液として、乳酸リングル液 (LR 群) と生理食塩水に分散された Hb 小胞体溶液 ([Hb] = 10 g/dL, HbV 群) を用いた。

群内の全血に対する希釈による測定値の変化を Wilcoxon の符号付順位検定で、群間の比較を Mann-Whitney の U 検定で行い、危険率 0.05 未満を有意差ありとした。

C. 結果

対象の全血における血色素濃度、ヘマトクリット、血小板数は、いずれも正常範囲内であった。フィブリノーゲン濃度は希釈により低下し、PT、aPTT は延長した。

ソノクロットの測定値である SonACT (Sonoclot Activated Clotting Time)、Time to peak は、2群とも希釈により延長し、Clot rate は縮小した。80%希釈時の SonACT のみ2群間に差がみられたが、その他のソノクロットによる測定値は差がなかった。

D. 考察

Hb 小胞体による血液希釈によるヒト全血の凝固能に対する影響は、*in vitro* において、乳酸リングル液とほぼ同等であった。しかし、Hb 小胞

体の大量投与時には凝固抑制効果が現れる可能性があり注意が必要かもしれない。しかし、Hb小胞体は晶質液に分散されていることや、生体内での網内系による凝固因子の補充もあり、投与の安全域は、今回の結果から推測されるおよそ40-60%希釈よりはもう少し高い値であることが予想される。

E. 結論

Hb小胞体の in vitro における、血小板機能を含む凝固機能に与える影響は、ほぼ、乳酸リンゲル液と同等である。

(参考文献)

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. A. Sakamoto, J. Matsumura, S. Mii, Y. Gotoh, R. Ogawa. A Prostaglandin E2 receptor subtype EP4 agonist attenuates cardiovascular depression in endotoxin shock by inhibiting inflammatory cytokines and nitric oxide production. *Shock.* **22**, 76-81 (2004)

2. M. Moriyama, A. Kitamura, H. Ikezaki, K. Nakanishi, C. Kim, A. Sakamoto, R. Ogawa.

Systemic ATP infusion improves spontaneous pain and tactile allodynia, but not hypesthesia, in patients with PHN. *J. Anesth.* **18**, 177-180 (2004)

3. A. Sakamoto, R. Ogawa, H. Suzuki, M. Kimura, Y. Okubo, T. Fujiya. Landiolol attenuates acute hemodynamic responses but does not reduce seizure duration during maintenance electroconvulsive therapy. *Psychiatry Clinical. Neurosci.* **58**, 630-635 (2004)

4. Y. Nakajima, K. Koizumi, T. Hirata, K. Hirai, A. Sakamoto, K. Shimizu. Successful thoracoscopic sympathectomy for primary erythromelalgia in the upper extremities. *Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **52**, 524-526 (2004)

5. M. Koda, A. Sakamoto, R. Ogawa. Effects of atrial natriuretic peptide at a low dose on water and electrolyte metabolism during general anesthesia. *J. Clin. Anesth.* **17**, 3-7 (2005)

6. A. Sakamoto, K. Nakanishi, S. Takeda, R. Ogawa. Does carboxy-hemoglobin serve as a stress-induced inflammatory marker reflecting surgical insults? *J. Nippon Med. Sch.* **72**, 19-28 (2005)

7. A. Kitamura, R. Satoh, T. Nagano, H. Matsuda, T. Shimizu, A. Sakamoto, R. Ogawa. Halothane modulates NMDA and non-NMDA excitatory synaptic transmission in rat cortical neurons. *J. Anesth.* **19**, 66-72 (2005)

2. 学会発表

1. 寺嶋克幸、杖下隆哉、坂本篤裕、小川龍 / (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」ウサギ急性出血性ショックモデルへの人工赤血球による fluid resuscitation の効果 / 第11回日本血液代替物学会年次大会 / 2004.7.13-14
 2. 寺嶋克幸、杖下隆哉、坂本篤裕、小川龍 / 人工赤血球溶液の組織酸素分圧と血管透過性に与える影響 —ウサギを用いた研究— / 第2回周術期体液代謝侵襲研究会 / 2004.8.7
 3. Terajima K, Tsueshita T, Sakamoto A, Ogawa R, Takeda S, Tanaka K, Miyashita M, Tajiri T./ Normovolemic resuscitation with Hemoglobin-vesicle solution in anesthetized rabbit acute hemorrhagic shock. / 2nd World Shock Forum. / 2004.10.30
 4. Terajima K, Tsueshita T, Sakamoto A, Ogawa R. / Normovolemic resuscitation with Hb vesicle solution in anesthetized rabbit acute hemorrhagic shock. / International Anesthesia Research Society 79th Clinical & Scientific Congress. / 2005.3.11-15
 5. Tsueshita T, Terajima K, Sakamoto A, Ogawa R./ In vitro effects of Hemoglobin-vesicle solution on coagulation using Sonoclot analysis. / International Anesthesia Research Society 79th Clinical & Scientific Congress. / 2005.3.11-15
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
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：Hb 小胞体の心筋虚血 - 再灌流障害に対する保護効果

分担研究者	大鈴 文孝	防衛医科大学校	第 1 内科学教室	教授
研究協力者	楠原 正俊	防衛医科大学校	第 1 内科学教室	助教授
	柳田 茂樹	防衛医科大学校	第 1 内科学教室	研究員
	加藤 隆一	防衛医科大学校	第 1 内科学教室	専修医
	別所 基明	防衛医科大学校	第 1 内科学教室	研究員
	濱 御幸	防衛医科大学校	第 1 内科学教室	技官

研究要旨

ラット摘出心臓のランゲンドルフ灌流モデルを用い、Hb 小胞体の心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果を検討した。Hb 小胞体原液を Krebs-Henseleit buffer で 30 倍希釈(Hb として 0.33 g/dL 相当)し、虚血を惹起する 10 分前から 10 分間灌流した。その後、30 分間の虚血を負荷し、続いて再灌流を行ったところ、明らかな心機能の回復が見られた。また、100 倍希釈した Hb 小胞体分散液では、この結果は得られなかった。これらの結果は、Hb 小胞体が何らかの心筋保護作用を持っている可能性があることを示唆した。

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 Hb 小胞体が有力な候補となっている。Hb 小胞体を外傷時や、出血時に緊急投与する際には、心臓への影響、特に虚血・再灌流時の心筋障害の発生への留意が必要となる。そこで、ラットの摘出心臓をランゲンドルフ灌流する方法を用いて、Hb 小胞体が虚血-再灌流時の心機能にどのような効果をもたらすかを予備的に検討した。

B. 研究方法

実験試薬類

実験に用いた Hb 小胞体、および対照として用いた空球小胞体は、オキシジェニクス社製の試料を用いた。灌流液の作製に用いた試薬類は、いずれも和光純薬の試薬特級を用いた。水は比抵抗 18.2 M Ω 以下の超純水を用いた。

実験動物と心臓灌流法

生後 9-12 週齢の Wistar 系雄性ラット(Charles River Japan Inc.)を用いた。ヘパリン(ノボ・ヘパリン注 1000、持田製薬) 1000 U を腹腔内投与し、10 分後に、xylazine hydrochloride 10 mg/kg (Sigma-Aldrich CO.)と ketamine hydrochloride (動物用ケタラール 50、三共ライフテック) 90 mg/kg を腹腔内投与して麻酔した。開腹・開胸して心臓を取り出し、直ちに氷冷した Krebs-Henseleit buffer (NaCl 116 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11.1 mM)(以下 KH-buffer と省略する)に投入して心臓の拍動を停止させた。大動脈にカニューレを挿入し、KH-buffer を用いて静水圧 100 cmH₂O、38°C でランゲンドルフ灌流した。KH-buffer は、実験開始前から終了するまで 95% O₂ + 5% CO₂ の混合ガ

スを通気し、pH を 7.4 に調整した。

心機能の測定

左心室に生理食塩水を満たしたラテックス・バルーンを挿入し、圧トランスデューサー(P-50, Gould Inc.)を介して多チャンネル記録計(WS-641G, Nihon Kohden)に接続し、左室発生圧(LVDP)を連続的に記録した。バルーンの内容積は、通常灌流時の左室拡張末期圧(LVEDP)が 0~5 mmHg になるようにした。coronary flow (CF) の測定は、実験を通じて灌流液を 5 分毎に採取しその volume を測定することで行った。

Hb 小胞体と空球小胞体の KH-buffer への分散

(a)Hb 小胞体 30 倍希釈分散液

純水約 180 mL に、KH-buffer の構成イオン成分を個別に溶解させた溶液を加え、次に Hb 小胞体原液 10 mL を加え、最後に純水で 300 mL にメスアップした。但し、NaCl 溶液の volume は、Hb 小胞体原液 10 mL が含有する NaCl (0.9%)を差し引いたものとした。

こうして作製した Hb 小胞体分散液の Hb 濃度は 0.33 g/dL 相当となる(30 倍希釈分散液)。

(b) Hb 小胞体 100 倍希釈分散液

上述の方法により作製した Hb 小胞体 30 倍希釈分散液 70 mL を取り、163.3 mL の KH-buffer と混合した。この Hb 小胞体分散液の Hb 濃度は 0.10 g/dL 相当となる(100 倍希釈分散液)。

(c)空球小胞体希釈分散液の作製

供給された空球小胞体原液は、対応する Hb 小胞体原液と等価であると考え、上述の Hb 小胞体の希釈と同様にして、30 倍および 100 倍希釈分散液を作製した。

こうして作製した Hb 小胞体と空球小胞体の KH-buffer 分散液は 38°C に加温し、95% O₂ + 5% CO₂

の混合ガスを 1 時間以上通気した後実験に用いた。

実験プロトコール

摘出心臓の灌流を開始し、安定的な灌流が得られるまで約 20 分間の control 灌流を行った。その後、以下の 3 群に分けて実験を行った。

(a)対照群

control 灌流直後に灌流を停止させて虚血 (ischemia)を惹起し、虚血を 30 分間継続した後再灌流を 30 分間行った(虚血 30 分-再灌流 30 分)。

(b)空球小胞体群

control 灌流直後に灌流液を空球小胞体希釈分散液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後直ちに虚血を惹起し、対照群と同様に虚血 30 分-再灌流 30 分の処置を行った。

(c)Hb 小胞体群

Hb 小胞体希釈分散液を用いて、空球小胞体群と同様に実験を行った。

データの計算と統計処理

現在実験を継続中であり、まだ例数が不十分であるので、計算や統計処理は行っていない。この報告では、各実験群の典型的な 1 例の心機能の測定結果を示した。

C. 結果

混合ガスの通気

Hb 小胞体原液(Hb 10 g/dL 含有)を、Hb 濃度として 0.33 g/dL、0.10 g/dL になるように KH-buffer で 30 倍および 100 倍希釈した分散液と、同じように処理した空球小胞体分散液に 95% O₂ + 5% CO₂ の混合ガスを通気したところ、どちらの分散液でも気泡が発生し、いずれの場合も高濃度の検体で顕著であった。また、その程度は、空球小胞体分散液と比べて Hb 小胞体の分散液の方でより顕著であった。しかしながら、いずれの場合も心臓を灌流する上で障害になることはなかった。今後は、より穏やかな通気の方法(膜型人工肺など)を検

討する必要がある。

心機能

(a) 対照群 (Fig. 1-A)

虚血開始直後に心臓は拍動を停止し、虚血 30 分の間この状態が継続した。再灌流開始直後から拡張末期圧(EDP)が急激に上昇し、その後緩やかに低下したが元に戻ることはなかった。さらに再灌流を 30 分行っても機能の回復は見られなかった。

(b) 空球小胞体群 (Fig. 1-B)

虚血を導入する前に、空球小胞体 30 倍希釈分散液 (Hb として 0.33 g/dL 相当) を 10 分間灌流したが、左室発生圧(LVDP)への影響は見られなかった。虚血時間中の経過は対照群とほぼ同じであった。再灌流を開始した後約 10 分間は対照群とほぼ同じ経過をたどったが、その後機能が回復した。

(c) Hb 小胞体群 (Fig. 1-C)

虚血を導入する前に、Hb 小胞体 30 倍希釈分散液(Hb として 0.33 g/dL 相当)を 10 分間灌流した時、(Fig. 1-C ではわかりづらいが)左室発生圧(LVDP)のわずかな低下が見られた。虚血時間中の経過は空球小胞体群とほぼ同じであったが、再灌流を開始した直後から明確な機能の回復が見られた。また、100 倍希釈分散液ではこの効果は見られなかった。

D. 考察

これまでの実験で、Hb 小胞体原液を KH-buffer で 30 倍希釈した分散液を、虚血を開始する前に 10 分間灌流すると再灌流後に心機能が明らかに回復することが判明した。この結果は、Hb 小胞体は何らかの心筋保護作用を持っていることを示唆するものである。ただ、空球小胞体分散液でも似たような効果が見られたので、Hb の寄与がどの程度であるかは今の段階では不明である。今後は、まずこの実験の例数を増やして、Hb 小胞体の心筋保護効果を明確に確認する。続いて、Hb 小胞体と空球小胞体の効果の差を明らかにするため、灌流液に吹き込む混合ガスの酸素含有量を 20%程度まで低

下させて実験を行いたいと考えている。また、空球小胞体も心筋保護効果を持っていると考えられるので、その点についても検討したい。

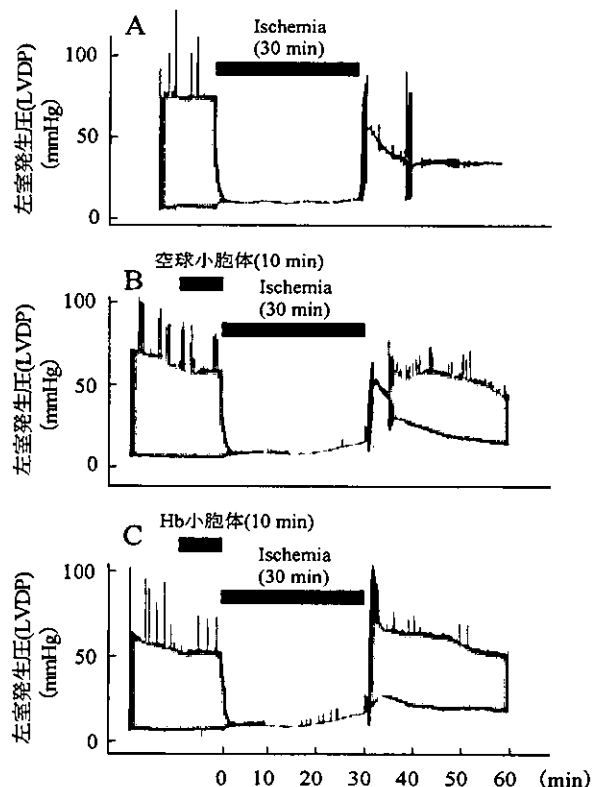


Fig. 1 Representative recordings of left ventricular developed pressure (LVDP) in three experimental groups. A: control group, B: empty vesicles group, C: Hb vesicles group

E. 結論

ラット摘出心臓のランゲンドルフ灌流モデルを用いて、Hb 小胞体の虚血-再灌流障害に対する保護効果を検討し、その効果を空球小胞体と比較した。Hb 小胞体原液を Krebs-Henseleit buffer で 30 倍希釈 (Hb 濃度 0.33 g/dL 相当)し、虚血を惹起する 10 分前から 10 分間灌流し、30 分間の虚血を負荷した後再灌流を行ったところ、明らかな心機能の回復が見られた。また、100 倍希釈した Hb 小胞体分散液では、この結果は得られなかった。これらの結果

は、Hb 小胞体が何らかの心筋保護作用を持っている可能性があることを示唆した。空球小胞体を同様に希釈した分散液でも同様の結果が得られたので、今後は Hb 小胞体と空球小胞体の効果の差を見出すための研究を進める。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. R. Ohmori, Y. Momiyama, M. Nagano, H. Taniguchi, T. Egashira, A. Yonemura, H. Nakamura, K. Kondo, F. Ohsuzu. An oxidized low-density lipoprotein receptor gene variant is inversely associated with the severity of artery disease. *Clin.Cardiol.* **27**, 641-644 (2004)
2. H. Taniguchi, Y. Momiyama, Z.A. Fayad, R. Ohmori, K. Ashida, T. Kihara, A. Hara, K. Arakawa, A. Kameyama, K. Naya, M. Nagata, H. Nakamura, F. Ohsuzu. In vivo magnetic resonance evaluation of associations between aortic atherosclerosis and both risk factors and coronary artery disease in patients referred for coronary angiography. *Am Heart J.*, **148**, 137-143 (2004)
3. K. Isoda, S. Sawada, N. Ishigami, T. Matsuki, M. Kusuhara, Y. Iwakura, F. Ohsuzu. Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**, 1068-1073 (2004)
4. Y. Momiyama, R. Ohmori, H. Taniguchi, H. Nakamura, F. Ohsuzu. Association of Mycoplasma pneumoniae infection with coronary artery disease and its interaction with chlamydial infection. *Atherosclerosis*, **175**, 139-144 (2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

別添 5

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
体外循環技術. 31,1-12 (2004) “最近の小児心臓手術における治療戦略および術式.”	2004年4月	日本体外循環技術研究会	森光晴 饗庭 了 加藤木利行 四津良平
日本輸血学会雑誌. 50,726-9 (2004) “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.”	2004年10月	日本輸血学会	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
J. Infect. Chemother. 10, 110-114 (2004) “Plasma hepatocyte growth factor is increased in early-phase sepsis.”	2004年4月	Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infections Diseases	K. Sekine S. Fujishima N. Aikawa
Ann Emerg Med. 44, 215-221 (2004) “Long-term survival of Japanese patients transported to an emergency department because of syncope.”	2004年9月	The American clooedge of Emergency Physicians	M. Suzuki S. Hori I. Nakamura K. Soejima N. Aikawa
日本臨床. 62, 2291-2295 (2004) “SIRS・sepsisの重症度評価.”	2004年12月	日本臨床社	栗原智宏 藤島清太郎 相川直樹
日本臨床. 62, 2173-2176 (2004) “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.”	2004年12月	日本臨床社	相川直樹 藤島清太郎
日本臨床. 62, 2166-2171 (2004). “高サイトカイン血症の病態生理.”	2004年12月	日本臨床社	藤島清太郎 相川直樹
J. Emerg. Med. 28, 237-241 (2005) “Emergency medical services in Japan: an opportunity for the rational development of pre-hospital care and research.”	2005年2月	Elsevier Inc.	MR. Lewin S. Hori N. Aikawa

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 , 4317-4325 (2004). "Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model."	2004年8月	Elsevier Ltd.	H. Sakai H. Horinouchi Y. Masada S. Takeoka M. Takaori K. Kobayashi E. Tsuchida
<i>ASAIO J.</i> 50 , 458-463 (2004). "Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier Hemoglobin Vesicle (HbV) maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor alpha (TNF α)."	2004年11月	Lippincott Williams & Wilkins	A. Yoshizu Y. Izumi S. Park H. Sakai S. Takeoka H. Horinouchi E. Ikeda E. Tsuchida K. Kobayashi
<i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> 311 , 874-884 (2004) "Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days."	2004年12月	The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics	H. Sakai Y. Masada H. Horinouchi E. Ikeda K. Sou S. Takeoka M. Suematsu K. Kobayashi E. Tsuchida
<i>Bioconjugate Chem.</i> 15 , 1037-1045 (2004). "Reduction of Methemoglobin via Electron Transfer from Photoreduced Flavin: Restoration of O ₂ -Binding of Concentrated Hemoglobin Solution Coencapsulated in Phospholipid Vesicles."	2004年9月	American Chemical Society	H. Sakai Y. Masada H. Onuma S. Takeoka E. Tsuchida
<i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> 312 , 702-709 (2005). "Circulation kinetics and organ distribution of hb-vesicles developed as a red blood cell substitute."	2005年2月	The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics	K. Sou R. Klipper B. Goins E. Tsuchida WT Phillips

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>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> 288 , (2005) “Oxygen releasing of Hb-vesicles with different P ₅₀ s from transiently occluded arteriole in hamster window model.”	2005年5月 (予定)	The American Physiological Society	H. Sakai P. Cabrales A.G. Tsai M. Intaglietta E. Tsuchida
<i>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> 288 , H1885-H1982 (2005) “Oxygen transport by low and normal P ₅₀ Hb-vesicles in extreme hemodilution.”	2005年4月 (予定)	The American Physiological Society	P. Cabrales H. Sakai A.G. Tsai S. Takeoka E. Tsuchida M. Intaglietta
<i>Crit. Care Med.</i> (2005) “Hemodilution with polymerized and encapsulated hemoglobins improves oxidative energy metabolism in collateralized hamster flap tissue.”	印刷中	Lippincott Williams & Wilkins	C. Contaldo J. Plock H. Sakai S. Takeoka E. Tsuchida M. Leuing A. Banic and D. Erni
<i>Org. Biomol. Chem.</i> 2 , 3108–3112 (2004). “Synthesis of protoheme derivatives with a covalently linked proximal-base and their human serum albumin hybrids as artificial hemoprotein.”	2004年11月	The Royal Society of Chemistry	A. Nakagawa N. Ohmichi T. Komatsu E. Tsuchida
<i>J. Biomed. Mater. Res.</i> 71A , 63–69 (2004) “Exchange transfusion with entirely synthetic red-cell substitute albumin-heme into rats: Physiological responses and blood biochemical rests.”	2004年	Wiley Periodicals, Inc.	Y. Hunag T. Komatsu H. Yamamoto H. Horinouchi K. Kobayashi E. Tsuchida
<i>J. Am. Chem. Soc.</i> 126 , 14304–14305 (2004) “Dioxygenation of human serum albumin having a prosthetic heme group in a tailor-made heme pocket.”	2004年11月	American Chemical Society	T. Komatsu N. Ohmichi P. A. Zunszain S. Curry 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>J. Biomed. Mater. Res.</i> 71A, 644–651 (2004). “Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein “Albumin-Heme” into an acute anemic rat model after seventy-percent hemodilution.”	2004年12月	Wiley Periodicals, Inc.	T. Komatsu H. Yamamoto Y. Huang H. Horinouchi K. Kobayashi E. Tsuchida
<i>Biochim. Biophys. Acta</i> 1675, 21–31 (2004) “Physicochemical characterization of cross-linked human serum albumin dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier.”	2004年11月	Elsevier B.V.	T. Komatsu Y. Oguro Y. Teramura S. Takeoka J. Okai M. Anraku M. Otagiri E. Tsuchida
<i>ASAIO J.</i> 50, 525–529 (2004). “Safety evaluation of artificial O ₂ -Carrier as red cell substitute “Albumin-Heme” by blood biochemical Tests and histopathology observations.”	2004年11月	Lippincott Williams & Wilkins	Y. Hunag T. Komatsu H. Yamamoto H. Horinouchi K. Kobayashi E. Tsuchida
<i>Bioconjugate Chem.</i> 16, 23–26 (2005). “Human serum albumin bearing covalently attached iron (II) porphyrins as O ₂ -binding sites.”	2005年1月	American Chemical Society	R.-M. Wang T. Komatsu A. Nakagawa E. Tsuchida
「新訂版・表面科学の基礎と応用」第5章、第12節 pp. 1333-1336、“人工赤血球”	2004年6月	エヌ・ディー・エス社	土田英俊 武岡真司 小松晃之 酒井宏水
<i>体液・代謝管理</i> 20, 3–6 (2004). “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”	2004年	体液・代謝管理研究会	小松晃之 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
日本医師会雑誌131, 907-910 (2004) “人工血液(人工赤血球)の開発動向”	2004年4月	日本医師会	武岡真司
「周術期輸液の最前線」 宮尾秀樹編集、pp.162-168、“酸素輸液の展望”	2004年7月	真興交易	武岡真司
臨床麻酔 29, (2005) “人工赤血球・人工血小板の開発の現状”	印刷中	真興交易	武岡真司
In: Organ Microcirculation: A Gateway to Diagnostic and Therapeutic Investigation. pp. 35-41, (2005) “Design and Modification of Nanoparticles for Blood Substitutes”	2005年	Springer-Verlag	S. Takeoka
In: Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 1-21, (2005). “Safety and Efficacy of Hemoglobin-Vesicles and Albumin-Hemes” .	2005年	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: Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 135-168, (2005). “Hemoglobin-vesicles (HbV) as artificial oxygen carriers” .	2005年	Springer-Verlag	H. Sakai K. Sou S. Takeoka K. Kobayashi E. Tsuchida
In: Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 193-204 (2005). “Oxygen-carrying plasma hemoprotein including synthetic heme”	2005年	Springer-Verlag	T. Komatsu E. Tsuchida