

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：H17-医薬-072)

平成 17 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 18 (2006) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	1～7
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）	8～12
2. 坂本 篤裕（日本医科大学 麻醉学教室 教授）	13～18
3. 外 須美夫（北里大学 医学部 教授）	19～21
4. 相川 直樹（慶應義塾大学 医学部 教授）	22～28
5. 大鈴 文孝（防衛医科大学校 第一内科学教室 教授）	29～34
6. 堀之内 宏久（慶應義塾大学 医学部 講師）	35～40
7. 小松 晃之（早稲田大学 理工学総合研究センター 助教授）	41～64
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	65～74
IV. 研究成果の刊行物・別冊	75

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・災害医療の臨床において輸血は必要不可欠な治療手段であり、安全で迅速な輸血治療が患者の予後を決定する場合も多い。時と場所を選ばずに使用でき、長期保存が可能な人工赤血球の開発は、救急・災害医療だけでなく次世代医療に重要な意義を持っている。平成17年度は平成15、16年度に引き続き救急・災害医療で想定される問題について検討し、臨床研究に進む上で貴重な成果が得られた。先ず、ヘモグロビン小胞体(HbV)を輸血の代わりに体外循環の補填液として安全に効果的に使用できるかについてビーグル幼犬を用いて検討した結果、体外循環終了後の循環動態は輸血使用と明らかな差はなく、脳血流を維持し得ることが示唆された。また、腹腔内出血を合併する救急患者にHbVを安全に使用でき、全身状態に悪影響を及ぼす可能性があるかについてラットを用いた動物モデルで検討し、循環動態、サイトカイン産生の点で対照群と有意差を認めず、安全に使用できることが示唆された。家兎を用いた出血性ショックの治療における多臓器の酸素分圧と血管透過性、心拍出量など循環、酸素代謝に関わる諸指標を同時に解析し、HbVの蘇生効果と蘇生後の臓器機能の保持効果が優れていることが明らかとなった。更に、虚血性疾患に対する人工赤血球の効果は、心筋虚血・再灌流モデルを用いて検討し、心筋保護効果があることが示された。脳虚血については血圧を維持しつつ血管拡張を行うことで梗塞巣の拡大が抑制されることが明らかとなり、脳虚血を有する患者へのHbV投与時の留意点として重要な結果が得られた。

人工赤血球として使用が考えられているHbVを循環血液中より安全に除去できる方法が開発されたことにより、HbVを限定的に使用できる可能性が示唆され、より広く臨床に適用できると考えられた。

有茎皮弁の虚血領域の微小循環が、酸素親和度が高く血液粘度の高いHbVで血液希釈することにより改善し、組織内壊死細胞も減少し、皮弁生着の促進が期待されると考えられた。さらに、酸素親和度の高いHbVを用いて高度の血液希釈を行った場合、皮下組織血流の保持、酸素供給の増大を認め、使用条件を換えることでHbVの適応拡大につながる成果と考えられた。しかし、臓器血流について同様の結果が得られるかについては今後検討すべきであると考えられた。

HbVの自動酸化による機能劣化を防止するためL-Tyrを用いた検討を行い、metHbとL-Tyrを共存させることにより、Hb変性によるHbVの機能低下を回避できる可能性が示唆された。

アルブミン-ヘムにポリエチレングリコール(PEG)を導入することにより、血中滞留時間の延長が認められた。PEGの分子量が2000、マレイミド型の修飾を行った物質が酸素結合能、滞留時間延長効果、膠質浸透圧と粘度の上昇抑制の点で新しい人工酸素運搬体としての可能性があると考えられた。また、 $\alpha^3\beta$ 型のアルブミンヘムを開発し、酸素親和性が若干高いが、新しい酸素運

搬体として検討する必要があると考えられた。

以上救急医療において HbV の適応を広げることができる結果が得られた。臨床応用された際の問題点を予め動物実験で解決し、至適効果を引き出す安全性の高い使用法（投与スピード、投与量、投与方法）について更に検討することが必要であるが、第一期(平成 15～17 年度)の最終年度として、臨床応用を踏まえた基礎検討が進展し、人工赤血球が救急・災害医療として利用可能であることを動物投与試験から具体的に明示することができ、当初の目標を完了させた。

分担研究者

坂本 篤裕	日本医科大学麻酔科	教授	大鈴 文孝	防衛医科大学第 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	早稲田大学理総研	助教授

A. 研究目的

本年度は、平成 15・16 年度の成果を踏まえ、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(HbV)とアルブミン-ヘムを対象とし、*in vitro*、および *in vivo* で以下の点について検討することを目的とした。① 人工心肺の補填液として HbV を臨床応用する際の基礎的データを収集するため、ビーグル幼犬を用いてモデルを確立し、HbV の効果を確認する。② 救急医療で遭遇する腹腔内出血による出血性ショックモデルにおいて HbV を投与した際、出血とともに腹腔内にもれた HbV が組成に与える影響を循環動態およびサイトカイン産生の面から検討する。③ 出血性ショックに HbV を用いた蘇生を行った際の臓器別の酸素分圧の変化と血管透過性について検討する。④ 心筋の虚血に HbV を用いた際の再灌流障害に対する保護効果についてランゲンドルフ灌流装置を用いて *in vitro* で検討する。⑤ ラットを用いた脳虚血・再灌流モデルを用いて HbV が脳組織に与える遠隔期の影響を検討する。⑥ 循環血液から HbV を選択的に分離除去するための方法を検討する。⑦ HbV 投与による有形皮弁虚血領域の酸素化を検討する。⑧ 高度血液希釈における高酸素親和度 HbV の効果を検討する。⑨ L-Tyrosine を基質としたメトヘモグロビンによる H_2O_2 消去機構の解明。⑩ ポリ

エチレングリコール(PEG)修飾アルブミンヘムの合成、物性と酸素結合能の評価。⑪ $\alpha^3\beta$ 型ヘムを活性中心とするアルブミン-プロトヘム複合体における酸素結合機能の検討、活性ヘムサイトの構造変換と酸素結合能の調節機序を解明すること、である。

B. 研究方法

平成 15、16 年度の研究成果を踏まえ、本年度は動物実験として以下の方法を用いた。① 新生児の体重に近い、体重 3.0～4.0kg のビーグル犬人工心肺モデルを確立した。ローラーポンプと動物実験用膜型肺を用いて人工心肺回路を作成し、回路の充填液を、5%リコンビナントアルブミン（アルブミン群）、HbV（HbV 群）、同種血（同種血群）の 3 群に分け人工心肺を 90 分運転、人工心肺終了後回路内の希釈された血液を遠心して濃縮、輸血を行い、120 分間、経時的に循環動態、酸素消費、酸塩基平衡等について観察を行った。HbV 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。人工心肺回路の充填量は 100ml とした。② ラットを用い、循環血液量の 50%を脱血し出血性ショック状態を作成、ショック作成 5 分後に自己血あるいは HbV 分散液を腹腔内投与することにより、腹腔内出血をモデル化、ショック作成 30 分

後に生理食塩水により蘇生を行い、蘇生後 3 時間にわたり循環動態を観察、経時的に採血を行い、血中のサイトカイン (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α) の産生状況を測定した。③ ニュージーランドホワイト系 (平均体重 2.26kg) のウサギを用い、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、5%リコンビナントアルブミン (rHSA) 溶液、5%rHSA 加 HbV 分散液で行った。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。④ Wistar 系ラットを用い、心臓を摘出、ランゲンドルフ灌流装置にセットし、灌流を行った。灌流を停止して 30 分間の虚血状態を惹起した後再び灌流を行った。灌流液としてクレブスヘンゼライト液 (KH 液)、HbV 希釈分散液 (Hb 濃度として 0.1g/dl、あるいは 0.33g/dl)、Hb を含まない空小胞体分散液を用いた。冠灌流量、心拍数、左室発生圧 (LVDP)、左室拡張終末期圧 (LVEDP)、灌流液中の乳酸濃度を経時的に測定し、再灌流後の心筋保護効果について検討した。⑤ SD 系ラットを用い、HbV 分散液 (5%rHSA、Hb 濃度 8.6g/dl) を用いて 10% の血液交換を行った。血管拡張を目的として硝酸イソソルビド (ISDN, isosorbide dinitrate) を 0.1、0.25mg 投与した。また、ISDN を 0.25mg 投与する群では ISDN による血圧低下を抑制するためにフェニレフリンを投与する群も検討した。対照群としては Hb を含まない空小胞体を用いた。脳虚血モデルとしてラット中大脳動脈を一過性に閉塞するモデルを用いた。左中大脳動脈領域を 2 時間虚血とした後再灌流させ、覚醒後 2 日目に犠牲死、脳虚血領域を評価した。⑥ ビーグル犬を用いて行った出血性ショックモデルに HbV を投与し、評価する実験終了後に脱血犠牲死させ、HbV を混じた血液をえた。これを遠心分離式血液成分分離装置・TEC204 を用いて血液成分分離を行った。血漿成分に浮遊する HbV を分離するために膜型血漿分離器 (プラズマフロー OP-02W) を用いた。⑦ Syrian Golden

Hamster を用い、背部皮膚より小動脈と小静脈で栄養される有茎皮膚弁を作成、皮膚内に側副血行のみで血流が維持される虚血領域を作成、酸素親和度の高い HbV 投与による血液希釈後に有形皮膚虚血領域の血流動態、酸素分圧を測定し、HbV による酸素加の改善を観察した。⑧ 高度血液希釈における高酸素親和度 HbV の末梢微小循環に与える効果を検討した。⑨ メト化した Hb は自動酸化により生成するが、反応性に富むヘムを有するため、L-Tyrosine 共存下で発現する FerrylHb ラジカルのペルオキシダーゼ活性による metHb への還元機構の解析を ESR, UV-vis スペクトル測定によっておこなった。⑩ アルブミン-ヘムの血中滞留時間を延長するために PEG 誘導体による表面修飾を検討した。PEG 鎖の導入は片末端マレイミドメトキシ PEG、片末端スクシンイミドメトキシ PEG を用いてアルブミンの Lys 残基に結合させるものとし、4 種類の PEG を用いて修飾を行った。酸素結合能はレーザーフラッシュフォトリス法にて測定、血中滞留時間は Wistar ラットに静注して経時的に採血し、比色によって濃度を決定した。⑪ ポルフィリン面上に 4 本の側鎖が立ち上がる α^4 型ヘムは製造工程が多段階にわたり、収率向上のためにきめ細かな調節が必要である。側鎖を 3 本とした $\alpha^3\beta$ 型ヘムを活性中心とするアルブミン-プロトヘム複合体を合成し、合成工程、効率を検討した。

C. 結果

動物実験では以下の結果が得られた。① ビーグル幼犬に人工心肺を装着して運転、装置を停止後生存させるモデルは今まで報告がなく、方法の確立を行った。人工心肺運転中の溶血や出血による強い血液希釈が当初見られたが、脱血管の深さ、位置の工夫、手術手技や人工心肺運転技術の調整により解決した。対照群として無輸血で人工心肺を行うアルブミン充填群における人工心肺運転中のヘマトクリット値は 20% 台を維持できるようになった。人工心肺運転中、離脱後の動脈血と頸静

脈血との酸素含有量の差分が脳の酸素代謝総量に比例すると考え、3群で比較した。アルブミン群 (n=4)、HbV 群 (n=3)、同種血群 (n=1) 間において、人工心肺運転前に対する人工心肺離脱後の頸動脈血流量変化に有意差を認めないが、HbV 群でより保たれる傾向にあった。② 雄性 Wistar 系ラットには安定した出血性ショック状態を作成することが可能であった。腹腔内に自己血、HbV 分散液を投与したところ、ショック状態に大きな変化は認められず、蘇生後の循環動態の変動も自己血注入群、HbV 注入群の間に有意差を認めなかった。サイトカイン測定の結果、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IFN- γ は自己血注入群、HbV 注入群のいずれの測定点においても測定限界値付近の値をとり、発現の増強は認められなかった。IL-2 はショック蘇生直後に若干低値をとったが、60 分後にはショック前の値に回復、その後変動は認めなかった。GM-CSF、TNF- α は生理活性を呈する範囲内での変動は認めず、発現の増強を示さなかった。ショック蘇生後の値は実験開始前値に比して低値であったが、ショック蘇生 180 分後には回復していた。IL-10 は自己血注入群ではショック覚醒時の値の実験開始時 $0.41 \pm 0.56 \text{ pg/dl}$ と非常に低値を取っており、ショック蘇生 180 分後は $36.8 \pm 44.2 \text{ pg/dl}$ と上昇した。一方 HbV 注入群でもショック蘇生 180 分後には $11.09 \pm 19.75 \text{ pg/dl}$ と上昇を認めた。両群間には有意差を認めていないが、腹腔内に自己血あるいは HbV を注入することにより時間の経過とともに IL-10 の産生が亢進する可能性が示唆された。③ 出血性ショックにより全ての群で中心静脈圧および心係数が低下した。乳酸リングルによる蘇生では蘇生後 2 時間以内に再度、動脈圧、中心動脈圧、心係数が低下した。HbV 投与群では乳酸リングル液投与群に比べ、蘇生後の動脈血乳酸値が低下し、過剰塩基が増加した。酸素消費量は、アルブミン投与群に比べ HbV 投与群の方が高かった。膠質浸透圧は、ショック後低下し、アルブミン投与で蘇生後は回復するが、乳酸リングルを用いた

蘇生では低下した。晶質浸透圧は群間に差はなかった。

組織酸素分圧は、出血性ショックによって各臓器とも低下した。蘇生後に組織酸素分圧は回復し、特に HbV 投与群では、その回復は他の群に比べ早く認められた。アルブミン投与群でも蘇生後 2 時間には、組織酸素分圧は回復した。④ 冠灌流量には各群間に有意差を認めなかった。心拍数は HbV で灌流した群で心拍の回復が良好であった。左室拡張末期圧 (LVEDP) は虚血時に上昇、虚血終了後対照群では上昇したままであったが HbV 群では上昇の程度が低く、対照群に比して有意差があった。左室発生圧 (LVDP) も HbV 群で他の群に比し有意な上昇を認めた。灌流液中の乳酸濃度には各群間で有意差はなく、灌流後低下した。遊離乳酸量の推移ではすべての群で再灌流後低下したが HbV 灌流群では再灌流 10 分後には他の群に比し有意に低く、灌流 30 分後には有意に高かった。⑤ 左中大脳動脈の虚血再灌流後、慢性期の脳虚血領域の評価では HbV 投与後の虚血による脳梗塞の範囲が ISDN 投与と昇圧剤の投与により抑制された。⑥ 血球成分分離器による赤血球分画の回収率は 85.5% であり、HbV の混入はわずかであった。また、膜型血漿分離器を用いた血漿タンパク分画の分離により 84% の HbV が回収された。血漿蛋白分画として回収された液体中には Hb は検出されず、この方式による HbV の分離が可能であることが明らかとなった。⑦ 酸素親和度の高い HbV を高粘度の HES (ヒドロキシエチルスターチ) に分散させて血液希釈を行うと虚血領域の赤血球流速、有効毛細管密度が増加した。虚血領域での壊死細胞数も減少した。⑧ ヘマトクリット濃度を 45% から 18% に低下させるように 5% アルブミン溶液を用いて血液希釈を行うと皮下微小循環においては高酸素親和度 HbV は酸素運搬、組織酸素分圧、微小循環血流を効率よく維持することが明らかとなった。⑨ 1 mM の L-Tyr を添加した metHb 溶液は 40 分で完全に H_2O_2 を消去した。metHb 溶液に H_2O_2 を添

加すると ferrylHb ラジカルが生成されることが ESR により確認された。またこのラジカルは自動的に減少し、Hb の変性が起こっていることが認められた。L-Tyr を加えると、変性が抑制され、metHb への還元を示した。⑩ PEG 修飾により修飾される PEG 鎖は調節が可能であった。PEG 鎖の分子量を 5000 とすると粘度が上昇し、分子量 2000 の PEG 鎖を導入したものが膠質浸透圧が 22~27mmHg で未修飾のアルブミンヘムに近い値を示した。酸素結合能は修飾の有無により大きな変化を認めなかった。血中半減期の検討ではマレイミド型の修飾を行ったもので滞留時間の延長が認められた。⑪ $\alpha^3\beta$ 型のアルブミンヘムは酸素を可逆的に吸脱着し、酸素運搬体として機能する可能性が示唆された。 P_{50} は 33 mmHg と比較的高い酸素親和度を示した。

D. 考察

救急・災害医療では、さまざまな病態を持つ患者に速やかに診断を下し、迅速に治療を施す必要がある。さまざまな病態に適応した人工赤血球の投与方法とその効果について検討しておくことは今後臨床応用が開始される際に必須となると考えられる。本年度は HbV の供給体制を安定化させ、動物実験による研究が進んだ。

① 体外循環の補填液としての使用は心臓血管外科手術、特に新生児、乳児の手術における概念を変える可能性があり、緊急手術の際に得られる利益は大である。前年度ラットを用いて HbV の使用が高次脳機能の低下を抑制することが明らかとなったので、臨床で考えられる小児開心術をモデル化し、ビーグル幼犬における脳血流の変化を確認したところ HbV 群で他の群に比して脳血流が保たれる傾向を見出した。今後生存実験を通して解析すべきと考えられた。② 腹腔内出血を伴う外傷時に HbV が安全に使用できるかを調べるために、腹腔内出血を伴う出血性ショックモデルを作成、

通常の蘇生を行った際の循環動態の変動とサイトカイン産生の変化を経時的に検討したところ、自己血を腹腔内に注入した群と HbV 分散液を注入した群との間に循環動態の変動に優位さを認めなかった。また、サイトカインの発現では IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IFN- γ では本実験の期間中ではほとんど発現を認めず、GM-CSF、TNF- α 、IL-2 ではショック蘇生直後に発現の低下を認めたが、蘇生 180 分後にはショック作成前の状態に復した。IL-10 は弱いながらも発現の増強を認めたが、HbV 分散液注入群ではその発現の増強が自己血注入群に比して抑制されている傾向にあり、また、強い発現ではなかった。以上の結果は炎症性サイトカインの産生は腹腔内出血単独では認められず、また、HbV をこのような病態に安全に投与できる可能性を示唆したものと考えられた。③の研究では、多臓器の酸素分圧を同時に検討し、心拍出量と酸塩基平衡、血管透過性を測定し、出血性ショック時に HbV を使用した際の多臓器への影響を検討したものであるが、HbV 分散液では各臓器での組織酸素加が早期より改善し 2 時間後も血行動態は安定し、組織酸素分圧も維持されており、出血性ショックの治療に効果があり、臓器の酸素加の点で蘇生による臓器機能も保たれる可能性が示唆された。④ 心筋虚血後の再灌流で、HbV を含む液体を用いた場合心拍数の回復、左室発生圧の回復、左室拡張末期圧の上昇抑制が顕著に認められ、心機能の回復に寄与していることが明らかとなった。同時に測定した乳酸濃度の検討では、再灌流直後に HbV によると考えられる濃度低下を認め、HbV が心筋保護効果を担っている可能性が示唆された。HbV によって運ばれる酸素が心筋細胞の呼吸に寄与し、乳酸の産生を抑制した可能性が推定される。⑤ 脳虚血、再灌流における梗塞巣の評価では、HbV は慢性期には縮小効果を示さなかったが、NO 供与体を投与して血管拡張を図り、更に血圧の低下を抑制するために昇圧剤を投与することによって HbV 単独投与群に比して梗塞巣の縮小を認めた。

脳虚血性疾患を伴う状態では、血圧の管理により虚血領域を拡大させずに HbV を使用できる可能性が示唆された。⑥ HbV は安全に投与することが可能であることを動物実験によって確認してきた。しかし、治療目的が達成されれば、血液中に残存する HbV を取り除く技術も必要である。血液成分分離器および血漿成分分離器を使用することにより HbV をほぼ完全に分離することが可能であった。赤血球分画を体外循環後に生体に戻すことにより、赤血球のロス(出血も含め)を限界まで低減できる可能性が示された。⑦ 虚血皮弁では毛細血管を介した側副血行路のみが血流を確保する経路となる。血液粘度を高く保ち、高酸素親和性の HbV を使用することによって有茎皮弁の虚血領域の微小循環が改善し、組織内壊死細胞も減少し、皮弁生着の促進が期待されると考えられた。⑧ HbV を用いて高度の血液希釈を行った場合、酸素親和性が高い HbV のほうが高い組織内酸素分圧を呈したことは皮下組織血流が保たれ、酸素供給が増大したためと考えられた。しかし、臓器血流については今後検討すべきであると考えられた。⑨ L-Tyr を添加した metHb 溶液は速やかに H₂O₂ を消去し、L-Tyr を基質とした ferrylHb ラジカルのペルオキシダーゼ活性によって metHb に還元されたものと考えられた。metHb と L-Tyr を共存させることにより、Hb 変性による悪影響を回避できる可能性が示唆された。⑩ アルブミン-ヘムに PEG を導入することにより血中滞留時間の延長が認められた。PEG の分子量が 2000、マレイミド型の修飾を行った物質が酸素結合能、滞留時間延長効果、膠質浸透圧、粘度の上昇抑制の点で新しい人工酸素運搬体としての可能性があると考えられた。⑪ α³β 型のアルブミン-ヘムは酸素親和性が若干高いが、構造による影響と考えられた。新しい酸素運搬体として検討する必要があると考えられた。

E. 結論

平成 17 年度は平成 15,16 年度に引き続いて、救

急・災害医療で想定される諸問題について検討が行われ、臨床研究に進む上で貴重な成果が得られた。3kg のビーグル幼犬における体外循環モデルの確立と HbV を補填液とした体外循環の成功と体外循環中および体外循環後の脳血流の保持が認められ、臨床応用への開発研究を加速させる結果が得られた。

また、腹腔内出血において HbV が腹腔内に流出することがあっても蘇生の経過には影響を与えず、サイトカイン産生にも大きな影響を与えないことが明らかとなり、救急医療における適応を広げることができる結果が得られた。

出血性ショックにおける多臓器の酸素分圧と血管透過性、心拍出量など循環、酸素代謝に関わる諸指標を同時に解析し、出血性ショックでの HbV の蘇生効果と蘇生後の臓器機能の保持効果が優れていることが明らかとなった。

虚血性疾患に対する HbV の検討では心筋保護効果があることが推測され、今後その機序を解明する必要がある。脳虚血については血圧を維持しつつ血管拡張を行うことで梗塞巣の拡大が抑制されることが明らかとなり、脳虚血を有する患者への HbV 投与時の留意点として重要な結果と考えられた。

人工赤血球として使用が考えられている HbV を生体に恒常性を保つため、必要がなくなった時点で循環血液中より安全に除去できる方法が開発されたことにより、HbV を限定的に使用できる可能性が示唆され、より広い臨床応用に適応できると考えられた。

虚血皮弁では毛細血管を解した側副血行路のみが血流を確保する経路となる。血液粘度を高く保ち、高酸素親和性の HbV を使用することによって有茎皮弁の虚血領域の微小循環が改善し、組織内壊死細胞も減少し、皮弁生着の促進が期待されると考えられた。更に、HbV を用いて高度の血液希釈を行った場合、皮下組織血流が保たれ、酸素供給の増大を認め、酸素親和性が高い HbV の適応拡

大につながる成果と考えられた。しかし、臓器血流について同様の結果が得られるかについては今後検討すべきであると考えられた。

L-Tyr を添加した metHb 溶液は速やかに H_2O_2 を消去し、L-Tyr を基質とした ferrylHb ラジカルのペルオキシダーゼ活性によって metHb に還元されたものと考えられた。metHb と L-Tyr を共存させることにより、Hb 変性による HbV の機能低下を回避できる可能性が示唆された。

アルブミンへムに PEG を導入することにより血中滞留時間の延長が認められた。PEG の分子量が 2000、マレイミド型の修飾を行った物質が酸素結合能、滞留時間延長効果、膠質浸透圧と粘度の上昇抑制の点で新しい人工酸素運搬体としての可能性があると考えられた。また、 $\alpha^3\beta$ 型のアルブミンへムは酸素親和性が若干高いが、構造による影響と考えられた。新しい酸素運搬体として検討する必要があると考えられた。

本年度は、第一期(平成 15-17 年度)の最終年度

として、臨床応用を踏まえた基礎検討が進み、評価すべき結果が多く報告された。人工赤血球が救急・災害医療として利用可能であることを実証するに足る結果を動物投与試験から具体的に明示することができ、第一期当初の目標を完了させた。しかし、臨床応用された際の問題点をあらかじめ動物実験で解決し、至適効果を引き出す安全性の高い使用法(投与スピード、投与量、投与方法)については更に検討することが必要である。第二期(平成 18-20 年度, 申請中)では、「血液製剤安定確保のための、体外循環・虚血性疾患等の治療に使用する人工酸素運搬体に関する研究」として、小粒径で血管作動性の低い人工赤血球の利点を最大限活用した臨床的適応を明確にするために、各種疾患モデル動物を用いた研究を行い、臨床試験に耐え得る機能: 体外循環(人工心肺)回路補填液、出血性ショック蘇生液、移植用臓器灌流液としての使用、更に虚血性疾患の治療薬としての効果を継続して追求する予定である。

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

分担研究者	四津 良平	慶應義塾大学医学部外科	教授
	饗庭 了	慶應義塾大学医学部外科	講師
	保土田 健太郎	慶應義塾大学医学部外科	助手

研究要旨

新生児や乳児の開心術の成績は近年飛躍的に向上しているが、一般的には人工心肺回路の充填液として輸血が必須である。これは、低体重の患者において無輸血充填を行った場合、高度の血液希釈が生じ、特に酸素需要の大きな脳の不可逆的障害を来す可能性が高いためである。一方で、輸血には感染症、移植片対宿主反応、免疫抑制、炎症性生体物質活性化による臓器障害といった合併症の危険を伴う。こうした臨床上のジレンマの一解決手段として、我々は人工赤血球として Hb 小胞体(HbV)に着目した。平成 16 年度では、ラット人工心肺モデルを確立し、HbV 充填群において高次脳機能が維持されることを証明した。これは HbV の充填により末梢組織への酸素運搬が保持されたためと考えられ、HbV の有用性が明らかとなった。そこで平成 17 年度では更に、幼若ビーグル犬を用いた人工心肺モデルを確立し、HbV 充填が脳血流量や酸素代謝の維持に及ぼす影響について検討を行った。

A. 研究目的

先天性心疾患を伴う体重 10kg 以下の乳児の開心術においては、同種血輸血による人工心肺回路充填が一般に行われている。その理由は、人工心肺回路の充填液は 300ml から 400ml 必要であり、これを晶質液で満たした場合、体重 10kg 以下の患者（循環血液量は約 800ml）では、高度な血液希釈が生じ、酸素運搬を担う赤血球の相対的な減少により組織障害、特に酸素需要の大きな脳の障害を来すためである。

このために、現在体重 10kg 以下の患者に体外循環を行う場合、赤血球輸血は避けられない状況にある。しかし一方で、輸血による感染症、移植片対宿主反応、免疫抑制といった弊害が明らかであり、また、炎症性生体物質の遊離を促進すること

による脳障害の発生も指摘されており、できるだけ輸血を避けるように努めるべきである。

この臨床上のジレンマの解決手段のひとつとして、我々は、人工赤血球である Hb 小胞体(HbV)に着目し、研究を進めてきた。平成 16 年度は、ラット人工心肺モデルを確立し、90 分間の人工心肺運転後 7 日間において神経学的認知試験を施行した。その結果、HbV 充填群では高次脳機能が維持されることが証明された。本研究では、HbV を人工心肺回路の充填液として使用することにより、高度な血液希釈状態における酸素供給不足を補うだけでなく、脳血流・脳酸素代謝の維持能について検討することを目的とした。

B. 研究方法

新生児の体重に近い、体重 3.0-4.0kg のビーグル犬人工心肺モデルを確立した。ローラーポンプと動物実験用膜型肺を用いて人工心肺回路を作成し、回路の充填液を、①5%リコンビナントアルブミン (rHSA 群)、②Hb 小胞体 (HbV 群)、③同種血 (同種血群) の 3 群に分けた。HbV は 5%rHSA に分散させ、Hb 濃度を 8.6 g/dL とした。人工心肺回路の充填量は 100ml とした。

ケタラル筋注によりビーグル犬を鎮静し、末梢静脈ラインを確保した。心電図モニタリング下にネンプタールを静脈投与後、気管内挿管 (6mm カフ付チューブ) を行った。セボフルレンで全身麻酔を維持した。左浅大腿動脈にカットダウン法で動脈圧ラインを挿入留置した。左側臥位とし、右頸静脈より外頸静脈を経て、中心静脈カテーテル (ダブルルーメン 5Fr.) を挿入留置、血流量測定のために右総頸動脈をテーピングした。右総頸動脈は迷走交感神経幹とともに右頸動脈鞘内にあるため、これを損傷しないように注意した。胸骨正中切開は行わず、右第 4 肋間開胸を加え、上行大動脈に送血管を、右房に脱血管を挿入し、人工心肺を確立した。それぞれ皮膚切開線はできるだけ小さくし、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、常温下に無拍動送血法で 120~160ml/kg の流量で 90 分間行い、人工心肺離脱後 120 分間、全身麻酔下に生存させた。人工心肺運転中の体温維持を目的に、回路に熱交換器を組み込んだ。人工心肺運転後、回路内血液を遠心分離し、血球成分を血管内に戻した。計測項目は、動脈圧、中心静脈圧、心拍数、直腸温、頸動脈血流量、心拍出量とした。また、動脈血、頸静脈血、混合静脈血について、血液ガス分析、lactate 濃度、ヘマトクリット値測定を行った。大動脈から脳への血流は、総頸動脈と椎骨動脈との二系統に分けられるが、頸動脈血流は脳血流の総量に比例すると考え、超音波ドップラー血流計で総頸動脈の血流を測定した。心拍出量として、上行大動

脈での血流を測定した。測定時点は、人工心肺運転前 5 分、運転開始後 15、30、60、90 分、人工心肺離脱後 15、30、60、120 分とした (Fig. 1)。

同種血群では、イヌ赤血球抗体 (DEA 1.1) 陰性のイヌをドナーとし、当日朝採取しヘパリン化した新鮮血を人工心肺回路の充填に使用した。

実験終了後、動物は犠牲死させ、脳組織を採取し、海馬部の病理学的評価を行う。

C. 研究結果

平成 17 年度前半は、人工心肺運転の確立のための予備実験を行った。体重 3~4kg の幼若ビーグル犬であったため、搬送や飼育に対するストレス反応が懸念されたが、当施設での飼育環境への適応に問題はなかった。また、喉頭や声門の構造が小さく、当初、気管内挿管に時間を要し、呼吸性アシドーシスを招くこともあったが、その後は技術

ビーグル犬急性人工心肺モデル

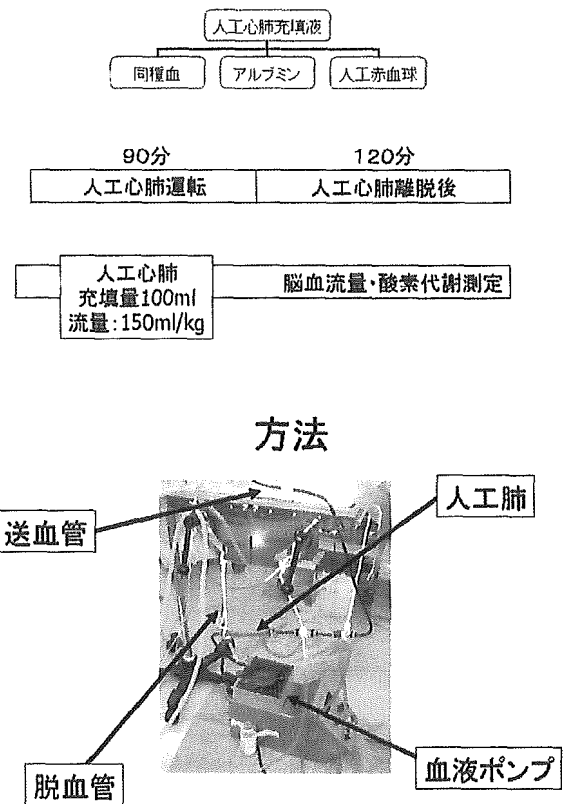


Fig. 1. ビーグル犬急性人工心肺モデルにより、HbV の充填液としての効果を評価する。

の習熟により問題なく麻酔導入ならびに維持を行うことができた。

人工心肺運転中の溶血や出血による強い血液希釈が当初見られたが、脱血管の深さ、位置の工夫、手術手技や人工心肺運転技術の習熟に伴い、いずれも解決した。現在、rHSA 充填群における人工心肺運転中のヘマトクリット値は 20%台を維持できるようになった。

人工心肺運転中、離脱後の動脈血と頸静脈血との酸素含有量の差が脳の酸素代謝総量に比例すると考え、3群で比較した。rHSA 群 (n=4)、HbV 群 (n=3)、同種血群 (n=1) 間において、人工心肺運転前に対する人工心肺離脱後の頸動脈血流量変化に有意差を認めないが、HbV 群でより保たれる傾向にあった。また、いずれの群も n を重ねている段階である。

D. 考察

人工心肺中の頸動脈血流量はいずれの群も比較的保たれているが、特に人工心肺離脱後 120 分の時点での頸動脈血流量の変化が大きく現れる傾向にあった。人工心肺離脱後 120 分の時点での頸動脈血流量は、rHSA 群では HbV 群より少ない傾向であったが、有意差は認めていない。rHSA 群における人工心肺離脱後の脳血流量の減少は、脳浮腫による脳圧上昇が灌流圧を下げているためと考えられる。また、同種血群では HbV 群に比し、人工心肺離脱後 120 分時点での頸動脈血流量が少ない傾向であったが、有意差を認めなかった。いずれも今後、n を重ねた上での検討が必要である。

HbV の血中半減期は約 20 から 30 時間である。本研究では人工心肺運転中の数時間に、酸素運搬体としての働きを担うことができればよい。厚生労働科学研究「人工赤血球の安全性の向上に関する研究」(主任研究者：小林紘一 慶大医教授)によれば、HbV が取り込まれる肝や脾の腫大が認められているが、機能障害などは認めず、安全性が示されている。したがって、人工心肺離脱後の HbV

の除去の要否、除去の方法について、検討が必要であり、現在研究が進行中である。

E. 結論

幼若ビーグル犬での人工心肺モデルを確立するに至った。今後、HbV が十分な酸素供給能を持つことに加えて、脳血流低下・脳血管抵抗増大を最小限にとどめる効果があることを証明することができれば、これが臨床応用に向けた一歩になると考える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1 論文発表

1. R. Aeiba, R. Yozu, M. Morita, T. Matayoshi / Total cavopulmonary connection: Open anastomosis of an extracardiac conduit with vacuum-assisted venous drainage. *Ann. Thorac. Surg.* **81**, 1146-7 (2006).
2. Y. Cho, T. Ueda, A. Mori, H. Shimizu, Y. Haga, R. Yozu R. Protective use of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists as a spinoplegia against excitatory amino acid neurotoxicity. *J. Vasc. Surg.* **42**, 765-71 (2005).
3. M. Kudo, R. Yozu. [Minimal invasive cardiac surgery using port-access method in elderly patients]. *Kyobu Geka.* **58**(8 Suppl), 670-4 (2005). Japanese.
4. Y. Sugano, T. Anzai, T. Yoshikawa, T. Satoh, S. Iwanaga, T. Hayashi, Y. Maekawa, H. Shimizu, R. Yozu, S. Ogawa. Serum C-reactive protein elevation predicts poor clinical outcome in patients with distal type acute aortic dissection: association with the occurrence of oxygenation impairment. *Int. J. Cardiol.* **102**, 39-45 (2005).

2 著書

1. 饗庭 了. 心臓外科 Knack & Pitfalls / 弁膜症外科の要点と盲点 高本眞一 監修 四津良平 編集 Ross 手術：自己肺動脈弁を用いた大動脈弁置換術 p103-5. 2005 文光堂 版

3 学会発表

1. 山崎真敬, 饗庭 了, 四津良平 / シンポジウム. 血液代替物の適応。人工心肺による体外循環モデルと人工赤血球による充填効果 / 第12回日本血液代替物学会年次大会 / 2005,6 / 東京
2. 饗庭 了, 四津良平, 山崎真敬, 岡本一真 / パネルディスカッション. 成人先天性心疾患：小児期手術例の長期予後 大動脈縮窄・離断(複合), 弁置換 (MVR, AVR)。大動脈縮窄および離断症に対する小児期修復術後成人期に至るまでの再手術について / 第41回日本小児循環器学会総会. 学術集会 / 2005,7 / 東京
3. 山崎真敬, 饗庭 了, 四津良平 / 会長要望演題. 無輸血開心術. ヘモグロビン小胞体を用いた人工心肺充填液の feasibility test / 第41回日本小児循環器学会総会. 学術集会 / 2005,7 / 東京
4. 林拓也, 古道一樹, 仲澤麻紀, 土橋隆俊, 福島裕之, 山岸敬幸, 饗庭 了 / 示説. 当院における ASD 無輸血手術成績 / 第41回日本小児循環器学会総会. 学術集会 / 2005,7 / 東京
5. R. AEBA, T. Anzai, M. Yamazaki, R. Yozu / シンポジウム. Fontan type procedure, state of art. Application of modern technologies for adult cardiac surgery to Fontan procedure. / The 18th Annual Meeting World Society of Cardio-Thoracic Surgeons-Japan Chapter. / 2005,7 / Nagano
6. T. Anzai, R. AEBA, R. Yozu / Port-access surgery for a patient with partial anomalous pulmonary venous connection. The 18th Annual Meeting World Society of Cardio-Thoracic Surgeons-Japan Chapter. / 2005,7 / Nagano
7. 饗庭 了, 安西 兼丈, 吉武 明弘, 四津 良平. / ビデオ.自己組織のみによる Nikaidoh 手術 / 第58回日本胸部外科学会総会 / 2005,10 / 岡山
8. 岡本一真, 饗庭 了, 安西 兼丈, 井上慎也, 吉武 明弘, 保土田健太郎, 山崎真敬, 鈴木 亮, 木村成卓, 武田尚一郎, 石田 治, 田野敦子, 小林美里, 四津良平 / 示説 Ross-Konno 手術の Shone's complex への適応拡大：合併する僧帽弁狭窄の限界について / 第58回日本胸部外科学会総会 / 2005,10 / 岡山
9. 山崎真敬, 饗庭 了, 四津良平.示説 / 乳児の無輸血開心術は本当に“安全”なのか？高次脳機能から見た実験的検討 / 第58回日本胸部外科学会総会 / 2005,10 / 岡山
10. Y. Miyagi, T. Anzai, K. Hotoda, R. AEBA, H. Kudo, H. Shimizu, R. Yozu / Port-access surgery for a patient with partial anomalous pulmonary venous connection. / The 22nd Congress of Pan-pacific Surgical Association, Japan Chapter. / 2005,11 / New Caledonia, France
11. M. Yamazaki, R. AEBA, R. Yozu / Use of Hemoglobin vesicle during cardiopulmonary bypass priming prevents neurocognitive decline in rat. / Abstracts of The 2005 Scientific Sessions of the American Heart Association. / Dallas, Texas, USA / November, 2005, Circulation 2005(Paper Presented)

12. 武田尚一郎, 工藤樹彦, 古梶清和, 饗庭 了,
山崎真敬, 金子剛士, 高橋辰郎, 宮木靖子, 四
津 良平 / ハーモニックスカルペルによる

myectomyが有効であったHOCMを伴った大動脈
弁狭窄症の一例 / 第 136 回日本胸部外科学会関
東甲信越地方会 / 2005,12 / 東京

分担研究報告書

救急・災害医療に利用可能な人工血液赤血球の開発に関する研究

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	坂本 篤裕	日本医科大学麻酔科学教室	教授
研究協力者	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、リコンビナントアルブミン 5%溶液(rHSA)、Hb 小胞体を rHSA に分散させた溶液(HbV/rHSA)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。乳酸リンゲル液の投与では一過性の循環改善効果のみであり、血漿成分の血管外漏出と臓器循環障害・低酸素性障害を生じた。HbV/rHSA 溶液では、蘇生後早期より臓器酸素化は改善し、蘇生後 2 時間は維持された。大量出血後の輸液蘇生にとって、HbV/rHSA 溶液は十分利用可能であり、蘇生から有効止血処置の間の処置として利用効果があることが示唆された。

A. 研究目的

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ばかりか、悪循環を生じ不可逆的に末梢循環不全を来す可能性がある。これに対し、Hb 小胞体(HbV)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、非代償性の出血性ショックに対しても臓器血流や酸素分圧の改善の効果が十分に期待できる。

出血性ショック時の HbV 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細胞外液補充液やコロイド溶液と比較する。これにより、出血性ショ

ック時の輸液蘇生としての HbV の急速投与による臓器血流や酸素運搬能とその維持効果を *in vivo* で明らかにする。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、12-14 週齢、体重 2.26 ± 0.25 kg を対象とした。ケタラール 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。サイアミラール 10 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 = 0.4, PCO₂ = 35-45mmHg となる様に人工呼吸を開始した。右内頸静脈よりカテーテルを挿入し、中心静脈圧を計測した。両鼠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・脱血の為に使用した。小開頭・

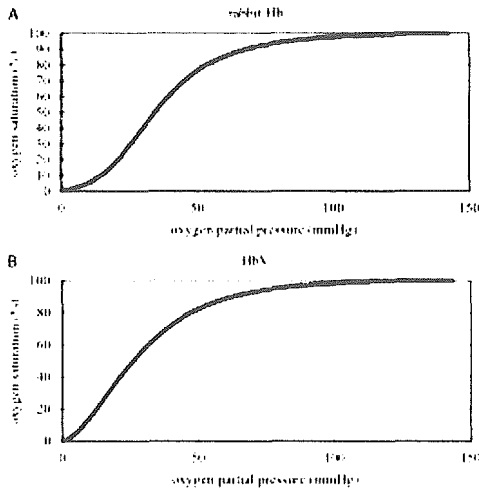


Fig. 1 ヘモックスアナライザーにより測定したウサギ赤血球 (A) と HbV (B) の酸素解離曲線

開腹により左大脳皮質・肝臓・腎皮質に、また単径部より Vastus lateralis muscles に微小酸素分圧電極 (栄行科学製) を挿入し、同時に記録した。血行動態安定後、動脈より血液ガス分析・浸透圧測定のために 0.5ml 採血した。耳静脈よりインドシアニングリーン (ICG) 1mg (1ml) を投与し、DDG アナライザー (DDG-3300 日本光電社製) にて循環血液量と心拍出量を測定した。血液ガス分析は ABL700 (Radiometer A/S, Copenhagen, Denmark) で行い、晶質浸透圧は vapor pressure osmometer (5520 Vapro®, Wescor Inc., Logan, UT, USA) で、膠質浸透圧は 4420

Colloid® (Wescor Inc.) で測定した。ベースラインでの測定後、平均血圧が 30-35mmHg (50%循環血液量相当) となるように動脈より脱血し、30 分間の安定後、Fluid Resuscitation を開始した。Fluid Resuscitation の輸液剤として、脱血量と等量の溶液 (乳酸リンゲル液 (RL 群)、リコンビナントアルブミン 5% 溶液 (rHSA) を添加した Hb 小胞体分散液 (HbV/rHSA 群)、rHSA 溶液 (rHSA 群))、または、脱血量の 3 倍量の乳酸リンゲル液 (3×RL 群) を用いた。蘇生直後、60 分後、120 分後に同様の測定を行った。ウサギ赤血球と HbV の酸素解離曲線は、ヘモックスアナライザー (TCS Medical Products, Inc., Philadelphia, PA) により 37°C にて測定し (Fig.1)、これを基に動静脈採血液の酸素分圧の実測値から赤血球と HbV の酸素飽和度を得た。HbV 由来の Hb 濃度の測定は、シアノメトヘモグロビン法の変法を使用した。酸素消費量は酸素飽和度の AV 較差と Hb 濃度、心拍出量より算出した。体血管抵抗も計算より求めた。

全ての値は、平均 ± 標準偏差で示した。組織酸素分圧と浸透圧はベースラインの値に対する百分率で示した。統計解析は、Statview® version 5.0 for Macintosh software (Abacus Concepts Inc., Berkley, California, USA) で行った。2 群間の比較は

Table 1 血行動態の変化。脱血直後(T1), 脱血 30 分後, 蘇生直後(T3), 蘇生 15 分後(T4), 1 時間後(T5), 2 時間後(T6)

	Baseline	T1	T2	T3	T4	T5	T6
MAP (mmHg)							
HbV/rHSA	85 ± 10	33 ± 11*	43 ± 31*	80 ± 10	90 ± 16	90 ± 17	90 ± 7
rHSA	89 ± 11	32 ± 9*	36 ± 27*	60 ± 14	76 ± 9	77 ± 9	83 ± 9
RL	79 ± 10	34 ± 11*	47 ± 31*	69 ± 9	56 ± 13*	51 ± 10*	54 ± 20*
3 × RL	80 ± 17	31 ± 31*	38 ± 7*	67 ± 12	62 ± 17	48 ± 20*	48 ± 16*
CO (ml · min ⁻¹ · 100g ⁻¹)							
HbV/rHSA	4.5 ± 1.2	3.0 ± 0.9*	2.8 ± 1.5*	5.8 ± 1.5	5.8 ± 1.5	4.2 ± 1.2	4.7 ± 1.2
rHSA	5.2 ± 1.7	3.2 ± 1.2*	3.0 ± 1.3*	5.9 ± 1.7	4.6 ± 1.5	4.7 ± 0.5	4.2 ± 0.8
RL	6.2 ± 1.3	2.7 ± 0.9*	2.8 ± 0.4*	4.7 ± 1.4	4.0 ± 1.7*	3.8 ± 0.8*	3.5 ± 1.0*
3 × RL	4.3 ± 1.0	2.9 ± 1.3*	2.8 ± 1.2*	5.5 ± 0.8	4.8 ± 1.2	3.7 ± 0.5	3.8 ± 1.0*
CI (ml · min ⁻¹ · m ²)							
HbV/rHSA	2.9 ± 0.7		1.2 ± 0.4*		2.9 ± 0.2	3.2 ± 0.8	2.8 ± 0.4
rHSA	2.7 ± 0.8		1.0 ± 0.2*		2.7 ± 0.7	3.3 ± 0.5	2.4 ± 0.6
RL	2.6 ± 0.9		1.1 ± 0.4*		1.8 ± 0.4	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.3*
3 × RL	2.9 ± 0.9		1.1 ± 0.2*		2.6 ± 0.3	1.9 ± 0.6	1.4 ± 0.4*
SVR (dyne · s · cm ⁻⁵)							
HbV/rHSA	1579 ± 738		1829 ± 423		1576 ± 294	1498 ± 440	1604 ± 288
rHSA	1834 ± 474		1956 ± 394		1600 ± 569	1820 ± 549	1912 ± 655
RL	1557 ± 564		2012 ± 695		1578 ± 509	1993 ± 587	2445 ± 1076
3 × RL	1575 ± 465		1868 ± 370		1374 ± 334	1420 ± 717	1848 ± 618

All animals were resuscitated using the same volume of HbV/rHSA, rHSA, or RL, or using 3 × RL over 15 min (T3). The hemodynamic variables were measured again after 15 min (T4), 1 h (T5), and 2 h (T6). All values are presented as mean ± SD (n = 6). *Significant difference from baseline (P < 0.05). †Significant difference from the RL group (P < 0.05).

Table 2 過剰塩基、乳酸値、混合静脈血酸素飽和度、酸素消費量の変化

	Baseline	T2	T4	T5	T6
BE (mmol L⁻¹)					
HbV/rHSA	0.4 ± 1.5	7.8 ± 2.9*	3.3 ± 2.3	0.2 ± 2.6	0.9 ± 2.5
rHSA	0.3 ± 3.8	6.4 ± 3.7*	6.7 ± 4.3*	0.9 ± 3.5	0.7 ± 2.8
RL	0.2 ± 3.8	7.7 ± 2.8*	6.2 ± 3.3*	4.2 ± 4.2*	5.7 ± 5.2*
3 × RL	0.9 ± 2.2	6.4 ± 3.7*	9.1 ± 6.3*	8.9 ± 9.3*	10.2 ± 9.1*
Blood lactate (mg dL⁻¹)					
HbV/rHSA	29.2 ± 16.3	89.3 ± 29.8*	51.0 ± 17.3	26.0 ± 11.5	25.7 ± 11.7
rHSA	25.2 ± 8.8	35.2 ± 44.4*	67.7 ± 39.6*	45.5 ± 25.5	41.2 ± 27.9
RL	33.0 ± 14.1	91.3 ± 15.6*	79.7 ± 16.2*	72.2 ± 24.6*	61.5 ± 37.3*
3 × RL	46.7 ± 27.3	103.8 ± 43.1*	111.0 ± 37.2*	94.8 ± 35.8*	107.3 ± 37.8*
Mixed venous blood oxygen saturation (%)					
HbV/rHSA	68 ± 9	39 ± 8*	62 ± 13	74 ± 11	66 ± 8
rHSA	67 ± 18	49 ± 13*	58 ± 11	64 ± 5	63 ± 4
RL	71 ± 14	50 ± 14*	51 ± 19	43 ± 12*	39 ± 11*
3 × RL	68 ± 9	38 ± 14*	61 ± 23	45 ± 17*	56 ± 25
Oxygen consumption (mL min⁻¹ m⁻²)					
HbV/rHSA	148 ± 64	83 ± 29*	154 ± 45	122 ± 21	148 ± 31
rHSA	124 ± 46	55 ± 19*	103 ± 32	77 ± 9	94 ± 16
RL	112 ± 22	72 ± 36*	97 ± 16	84 ± 6*	79 ± 10*
3 × RL	130 ± 55	82 ± 21*	82 ± 23*	106 ± 10	57 ± 27*

Animals were resuscitated using the same volume of HbV/rHSA, rHSA, or RL, or using 3 × RL, over 15 min. Observations were made 15 min (T4), 1 hr (T5), and 2 hr (T6) after the fluid resuscitation. All values are presented as mean ± SD (n = 6).

*Significant difference from baseline (P < 0.05).

†Significant difference from the RL group (P < 0.05).

Mann-Whitney U test で、群内の経時的な変化は Wilcoxon signed-ranks test で行、危険率 0.05 未満を有意差ありとした。

C. 研究成果

ベースラインの測定値を **Table 1** に示す。出血性ショックのための脱血量はそれぞれ、HbV/rHSA 群； 22.5 ± 3.7 、rHSA 群； 24.7 ± 4.7 、RL 群； 18.5 ± 4.8 、3×RL 群； 21.4 ± 7.4 mL/kg であり、有意差は無かった。すべての群は、出血性ショックにより中心静脈圧および心係数が低下した。Fluid Resuscitation 後 2 時間以内に、乳酸リングルによる蘇生された動物は、再度、動脈圧、中心動脈圧、心係数が低下した。

HbV/rHSA 群では RL 群に比べ、蘇生後の動脈血乳酸値が低下し、過剰塩基が増加した(**Table 2**)。酸素消費量は、rHSA 群に比べ HbV/rHSA 群の方が高かった。膠質浸透圧は、ショック後低下し、rHSA を用いた蘇生後は回復するが、乳酸リングルを用いた蘇生では低下した。晶質浸透圧は群間に差はなかった。

組織酸素分圧は、出血性ショックによって各臓器とも低下した。Fluid Resuscitation 後に組織酸素分圧は回復し、特に HbV/rHSA 群では、その回復

は他の群に比べ早く観られた。rHSA を用いた蘇生後 2 時間は、組織酸素分圧は高く維持されていた (**Fig. 2**)。

D. 考察

Hemoglobin Based Oxygen Carriers (HBOCs) は、肺から末梢組織への酸素運搬を補うために投与されるものである。しかし、分子状の修飾 Hb 溶液の場合はその特性より、末梢血管収縮のために末梢組織の低酸素症を来す危険があり、ひいては多臓器不全を引き起こす可能性がある。我々の等容量輸液蘇生では、輸液剤への HbV の添加は、末梢組織の酸素分圧を低下させず、むしろ速やかに回復させた。また、rHSA による膠質浸透圧の回復効果が、その後 2 時間以上の血行動態の維持をもたらしたことが明らかになった。

この研究対象は、出血のコントロールされた出血性ショックモデルであることから、出血のコントロールされていない、または、出血のコントロールのつかない出血性ショックに対しての、HbV 溶液大量投与による凝固系への影響は明らかではない。また、観察時間を蘇生後 2 時間までとしたのは、出血性ショック後に緊急的止血処置および輸液蘇生を同時に行い、その後病院等で治療的止

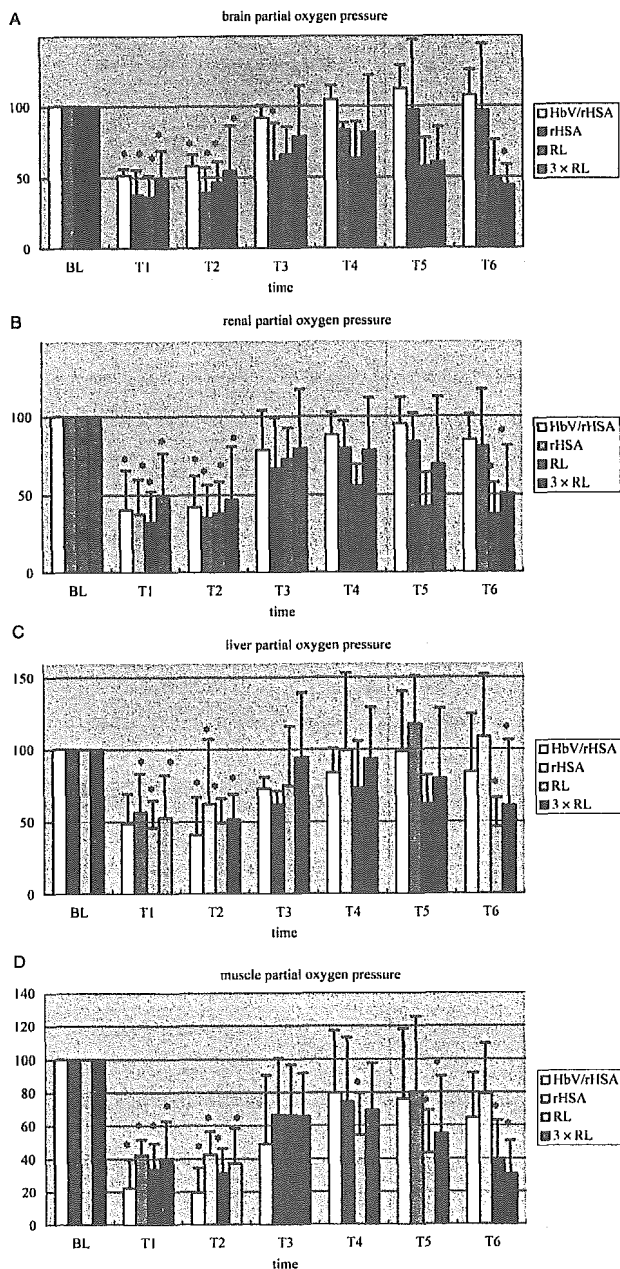


Fig. 2 臓器酸素分圧の変化. A 脳 B 腎臓
C 肝臓 D 骨格筋

血処置を行うことを想定した実験モデルのためである。治療的止血処置が行うことの出来る施設までの時間が極端に長いような臨床的場面を想定した研究も今後必要である。

さらに、今回の研究では、臓器の酸素分圧の評価は微小電極で行ったため、臓器内の酸素分圧の較差を表すことが出来ない。今後の調査に期待したい。

E. 結論

HbVを用いた Fluid Resuscitation は、微小循環や体循環を悪化させずに、出血性ショックによって障害された主要臓器の酸素分圧を速やかに回復させる。同時に投与される rHSA は、その効果を2時間以上維持するのに役立つ。

(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. 研究業績

1. 論文発表

1. A. Sakamoto, J. Imai, A. Nishikawa, E. Ito, M. Yanagisawa, R. Ogawa, S. Watanabe. Influence of inhalation anesthesia assessed by comprehensive gene expression profiling. *Gene* 356, 39-48 (2005).
2. Y. Sano, A. Sakamoto, Y. Oi, R. Ogawa. Anesthesia and circulating blood volume. *Eur. J. Anaesthesiol.* 22, 258-262 (2005).
3. 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).
4. 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).
5. Y. Yoshida, T. Hongo, A. Sakamoto, R. Ogawa. Successful management of tachycardiac atrial fibrillation in a septic with landiolol. *Anesth Analg.*

100, 294 (2005).

6. 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).
7. K. Terajima, T. Yamamoto, H. Onodera, S. Takeda, K. Tanaka, A. Sakamoto. Unmasking of Brugada syndrome by an antiarrhythmic drug in a patient with septic shock. *Anesth. Analg.* **102**, 233-236 (2006).
8. K. Terajima, T. Tsueshita, A. Sakamoto, R. Ogawa. Fluid resuscitation with Hemoglobin Vesicles in a rabbit model of acute hemorrhagic shock. *Shock*, **25**, 184-189 (2006.)

2 学会発表

1. 寺嶋克幸、杖下隆哉、坂本篤裕／ウサギ出血性ショックモデルに対する人工赤血球の臓 - 器酸素分圧と血漿浸透圧への影響／第 12 回血液代替物学会総会／2005.6.6／東京
2. K. Terajima, T. Tsueshita, A. Sakamoto. / Fluid resuscitation effects using Hemoglobin vesicles in anesthetized rabbit acute hemorrhagic shock. Xth International Symposium on Blood Substitutes. / 2005. 6. 13 / Providence, U.S.A.
3. 杖下隆哉、寺嶋克幸、坂本篤裕／人工赤血球およびラクトリンゲルの凝固能への影響／第 52 回日本麻酔学会総会／2005.6.2／神戸
4. K. Terajima, T. Tsueshita, A. Sakamoto, R. Ogawa. / Normovolemic resuscitation with Hemoglobin-vesicle solution in anesthetized rabbit

acute hemorrhagic shock. / International Anesthesia Research Society 79th Clinical & Scientific Congress / 2005.3.12. / Honolulu, U.S.A.

5. T. Tsueshita, K. Terajima, S. Takeda, A. Sakamoto, R. Ogawa. / In vitro effect of hemoglobin-vesicles solution on coagulation using sonoclot analysis. / International Anesthesia Research Society 79th Clinical & Scientific Congress. / 2005.3.14 / Honolulu, U.S.A.
6. 寺嶋克幸、藤井正大、竹田晋浩、小野寺英貴、池崎弘之、宮城泰雄、中西一浩、坂本篤裕、田中啓治、小川 龍／オフポンプ冠動脈再建術後におけるラン ジオロールによる脈拍数制御の心房細動発生率と循環動態に及ぼす影響／第 32 回日本集中治療医学会学術集会総会／2005.2.25／東京
7. 池崎弘之、竹田晋浩、中西一浩、寺嶋克幸、小野寺英貴、坂本篤裕、金 徹、田中啓治、小川 龍／適正な Off Pump CABG 術中輸液量—術後管理の見地から／第 32 回日本集中治療医学会学術集会／2005. 2. /東京
5. 寺嶋克幸、竹田晋浩、小野寺英貴、谷合信彦、金徹、山本剛、佐藤 直樹、田中啓治、高野照夫、小川龍、小田裕、浅田章／生体肝移植術後のデックスメドミジン反復投与による鎮静と安全性の検討／第 32 回日本集中治療医学会学術集会／2005.2.24／東京
6. 寺嶋克幸、小野寺英貴、小林克也、竹田晋浩、小川龍／抗不整脈薬 によって明らかとなった高齢者ブルガダ症候群の一例／第 52 回日本麻酔学会総会／2005.6.2／神戸
7. 吉田結富子、寺嶋克幸、竹田晋浩、赤田信二、

- 山本剛、佐藤直樹、金徹、北村晶、池崎弘之、中西一浩、設楽敏朗、田中啓治、高野照夫、坂本篤裕／当院 集中治療室におけるランジオロールの使用状況／第 14 回日本集中治療医学会関東甲信越地方会／2005.8.27／東京
8. 寺嶋克幸、坂本篤裕／小児の侵襲的処置におけるデクスメドミジンをを用いた鎮静経験／日本臨床麻酔学会第 25 回大会／2005.11.17／大阪
9. 寺嶋克幸、坂本篤裕、赤田信二、竹田晋浩／腎機能障害患者の冠動脈バイパス術の予後の危険因子／第 12 回外科侵襲とサイトカイン研究会／2005.12.17／東京
10. 佐藤直樹、山本剛、岩崎雄樹、淀川顕司、加藤浩司、村井綱児、寺嶋克幸、竹田晋浩、高野照夫、田中啓治／腎保護効果からみたナトリウム利尿ペプチドとフロセミド併用療法の問題点／第 33 回日本集中治療医学会学術集会総会／2006.3.2／大阪
11. 赤田信二、竹田晋浩、寺嶋克幸、中西一浩、小林克也、小野寺英貴、田中啓治、坂本篤裕／集中治療室における非侵襲的陽圧換気(NPPV)の使用状況の推移／第 33 回日本集中治療医学会学術集会総会／2006.3.3／大阪
12. 小野寺英貴、竹田晋浩、寺嶋克幸、赤田信二、中西一浩、金徹、佐藤直樹、本郷卓、田中啓治、坂本篤裕／ICU における非侵襲的陽圧換気(NPPV)と MRSA 発現症例の推移／第 33 回日本集中治療医学会学術集会総会／2006.3.2／大阪
13. 鈴木規仁、竹田晋浩、赤田信二、寺嶋克幸、中西一浩、本郷卓、田中啓治、坂本篤裕／非侵襲的陽圧換気(NPPV)施行時の鎮静：デクスメドミジンの効果／第 33 回日本集中治療医学会学術集会総会／2006.3.2／大阪
14. 山本剛、寺嶋克幸、加藤浩司、淀川顕司、岩崎雄樹、宮城泰雄、佐藤直樹、竹田晋浩、田中啓治、高野照夫／PCPS 回路交換後に高サイトカイン血症による一過性の白血球減少をきたした一例／第 33 回日本集中治療医学会学術集会総会／2006.3.2／大阪
15. 小林克也、竹田晋浩、寺嶋克幸、小野寺英貴、宮城泰雄、中西一浩、田中啓治、坂本篤裕／急性心筋梗塞後の心室中隔穿孔に対し NPPV と IABP の併用にて術前管理した一症例／第 33 回日本集中治療医学会学術集会総会／2006.3.2／大阪
16. 吉田結富子、赤田信二、寺嶋克幸、宮城泰雄、竹田晋浩、田島廣之、市川和雄、小原俊彦、田中啓治、坂本篤裕／外傷性腹部大動脈瘤ステント術後、腸間膜大動脈破裂によりショックに陥ったが、救命し得た一症例／第 33 回日本集中治療医学会学術集会総会／2006.3.2／大阪
17. 寺嶋克幸、竹田晋浩、赤田信二、田中啓治、池崎弘之、金徹、中西一浩、坂本篤裕／予定心臓手術患者でのデクスメドミジンの消化器系への影響／第 33 回日本集中治療医学会学術集会総会／2006.3.3／大阪