

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た。平成17年度は、慢性脳梗塞モデルを作製し、Hb小胞体(HbV)による血液置換、および、NO供与体のISDN(isosorbide dinitrate)の併用投与を実施し、2日後の脳梗塞域を組織病理学的に検討した。HbVでは、脳梗塞域を縮小させる明確な効果は認められなかったが、ISDNの併用投与と血圧維持が脳梗塞域を減少させる可能性が示唆された。

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, HbV) の投与で脳梗塞域をやや縮小させるものの (平成15年度報告)、慢性ラットモデルでは明確な縮小効果は認められなかった (16年度報告)。慢性ラットモデルで縮小効果が認められなかった原因として、HbVがNOをトラップするためにNOによる血管拡張作用が抑制されてHbVの虚血部位への酸素供給が不十分になる可能性を考え

て、平成17年度は、NO供与体である硝酸イソソルビドISDN (isosorbide dinitrate)を併用して実験を行った。

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、呼吸二酸化炭素濃度 (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ずつ行った。HbV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 (HbV群、n = 12) と、対照としてHbを含有しない空の小胞体で置換した群 (ContV群、n = 3) と、HbV+ISDN 0.1mg (ISDN 0.1群、n = 12)、HbV+ISDN 0.25mg (ISDN 0.25群、n = 12)、HbV+ISDN 0.25mg+フェニレフリン 0.6mg/hr (ISDN+Neo群、n = 12) の2群に分けた。ISDN+Neo群では、ISDN投与による血圧低下をフェニレフリンで回復させ、血圧を維持した。

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。脳血流は閉鎖型脳窓よりドップラー血流計を用いて測定した。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

血液置換により、ヘマトクリットはすべての群で、45%前後から25%前後へ低下した。血液pH, BE, PaO₂, PaCO₂, Blood sugarに群間で差は認められなかった。

平均動脈血圧は、ISDN 0.1群とISDN 0.25群が他の群より有意に低下した。ISDN+Neo群の血圧はHbV群やContV群と差が認められなかった。

脳梗塞領域(Fig. 1)は、HbV群が21%、ContV群が10%、ISDN 0.1群が25%、ISDN 0.25群が28%、ISDN+Phenyleph群が16%だった。ISDN 0.25群がもっとも大きく、次いでISDN 0.1群だった。HbV群はContV群より大だったが、ISDN+Phenyleph群がそれよりも小さく、HbV群における梗塞領域の大きさをISDN+フェニレフリンが抑制した。

D. 考察と結論

急性脳虚血モデルでは、脳梗塞範囲はHbV群で小さい傾向が認められたが、慢性梗塞モデルでは、HbV群ではその効果はみられなかった。このHbVの梗塞範囲に及ぼす影響にNOが関与する可能性を考えて、NO供与体のISDNを併用したが、ISDNの血管拡張が血圧低下を招き、それにより逆に梗塞範囲が拡大した。今回はISDN単独では実験をしなかった。もしISDN単独で血圧低下が梗塞範囲拡大に関与するならば、この血圧低下を血管収縮薬で回復させておけば、HbV使用時の梗塞範囲を減少させる可能性がある。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、HbVによる置換は空小胞体より脳梗塞領域が増

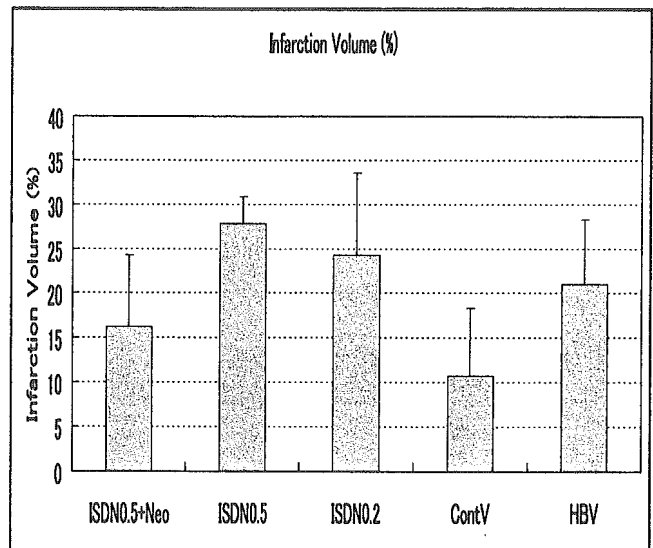


Fig. 1 各処置群の梗塞巣領域 (%)

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時間の変更、また他の梗塞モデルなどを検討し、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. T. Takenami, S. Yagishita, S. Murase, H. Hiruma, T. Kawakami, S. Hoka. Neurotoxicity of intrathecally administered bupivacaine involves the posterior roots/posterior white matter and is milder than lidocaine in rats. *Reg. Anesth. Pain Med.* **30**, 464-72 (2005).
2. M. Saito, T. Okutomi, Y. Kanai, J. Mochizuki, A. Tani, K. Amano, S. Hoka. Patient-controlled epidural analgesia during labor using ropivacaine and fentanyl provides better maternal satisfaction with less local anesthetic requirement. *J. Anesth.* **19**, 208-12 (2005).

3. T. Okutomi, M. Saito, K. Amano, K. Fukuoka, S. Hoka. Labour analgesia guided by echocardiography in a parturient with primary dilated cardiomyopathy. *Can. J. Anaesth.* **52**, 622-5 (2005).
 4. K. Yamaura, S. Hoka, H. Okamoto, S. Takahashi. Noninvasive assessment of left ventricular pressure-area relationship using transesophageal echocardiography and tonometry during cardiac and abdominal aortic surgery. *J. Anesth.* **19**, 106-11 (2005).
 5. M. Inamura, H. Okamoto, M. Kuroiwa, S. Hoka. General anesthesia for patients with Brugada syndrome. A report of six cases. *Can. J. Anaesth.* **52**, 409-12 (2005).
 6. H. Kokubun, M. Ouki, M. Matoba, H. Kubo, S. Hoka, K. Yago. Determination of oxycodone and hydrocotarnine in cancer patient serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Sci.* **21**, 337-9 (2005).
 7. A. Kanai, A. Suzuki, S. Hoka. Rapid injection of epidural mepivacaine speeds the onset of nerve blockade. *Can. J. Anaesth.* **52**, 281-4 (2005).
 8. T. Ogura, M. Ogata, H. Akita, S. Jitsuki, L. Akiba, K. Noda, S. Hoka, M. Saji. Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease. *Neurosci Res.* **51**, 299-308 (2005).
- (総説、著書)
1. 外 須美夫. 内因性カンナビノイドの役割. *臨床麻酔* **29**, 159-65 (2005).
- G. 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：腹腔内出血を伴う出血性ショックにおける血中サイトカインの変動について

分担研究者 相川直樹 慶應義塾大学医学部 救急部 教授
研究協力者 河野光智 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助手

研究要旨

外傷による出血性ショックに対する治療は大量出血例では外科的に止血操作を行うと同時に赤血球製剤の投与により、循環血液量の回復と酸素輸送能の回復を早期に図ることにより、状態を速やかに安定化させることができる。しかし、出血が大量でない場合、晶質輸液により循環動態を安定させ、出血で失われた血液成分を補充して保存的に治療を行うことも多い。特に鈍的腹部外傷による肝・脾損傷では腹腔内出血量を、腹部超音波所見を参考にしながら状態が安定していれば保存的に治療する方法がとられるようになった。この場合、腹腔内出血や臓器損傷により、白血球やリンパ球が活性化され、サイトカイン産生が亢進し、SIRS（Systemic Inflammatory Response syndrome）の状態が惹起されることがある。保存的治療を行う場合、輸血の代替として人工赤血球を使用した際には輸注した人工赤血球が腹腔内に流出し、蘇生効果に影響が出る可能性が考えられた。このため動物に於いて出血性ショック状態をモデル化し、腹腔内に血液あるいは人工赤血球を注入することによって免疫担当細胞などからのサイトカイン産生に及ぼす影響について知ることは、臨床現場での使用に当たって重要な検討事項であると考えられた。

A. 研究目的

外傷による出血性ショックに対する治療は大量出血例では外科的に止血操作を行うと同時に赤血球製剤の投与により、循環血液量の回復と酸素輸送能の回復を早期に図ることにより、状態を速やかに安定化させることができる。しかし、出血が大量でない場合、晶質輸液により循環動態を安定させ、出血で失われた血液成分を補充して保存的に治療を行うことも多い。特に鈍的腹部外傷による肝・脾損傷では腹腔内出血量を腹部超音波所見を参考にしながら状態が安定していれば保存的に治療する方法がとられるようになった。この場合、腹腔内出血や臓器損傷により、白血球やリンパ球

が活性化され、サイトカイン産生が亢進し、SIRS（Systemic Inflammatory Response syndrome）の状態が惹起されることがある。保存的治療を行う場合、輸血の代替として人工赤血球を使用した際には輸注した人工赤血球が腹腔内に流出し、蘇生効果に影響が出る可能性が考えられた。このため動物に於いて出血性ショック状態をモデル化し、腹腔内に血液あるいは人工赤血球を注入することによって免疫担当細胞などからのサイトカイン産生に影響を及ぼすか否かについて知ることは臨床現場での使用に当たって重要な検討事項であると考えられた。

B. 研究方法

雄性 Wistar 系ラット (326 から 354g 約 8 週齢) を用い、セボフルレンによる吸入麻酔・自発呼吸下に右頸動脈および頸静脈にカテーテル(SP31 I.D.05.mm, O.D.0.8mm 夏目社製)を留置、心電図をモニターし、保温装置を用いて体温を 37 度に保持しつつ実験を行った頸動脈カテーテルは血圧の測定と脱血に用い、頸静脈カテーテルは蘇生液の投与に用いた。

動物の状態が安定した後、循環血液量の 30% の血液を 5 分間で脱血し、ショック状態を作成した。脱血量の決定にはラットの循環血液量を 56ml/kg として計算した。脱血量は 5.3ml~6.0ml となった。脱血した血液には直ちにヘパリン 500 単位を加え、凝固を阻止し、自己血注入群では引き続き行う腹腔内投与のための自己血液とした。脱血終了 5 分後に 24G 針にて腹腔穿刺を行い、5ml の自己血あるいは Hb 小胞体(HbV)分散液を注入した。HbV 分散液はオキシジェニクス社が委託製造し、Hb 濃度 10g/dl として生理的食塩水に分散されている。ショック状態を 30 分維持した後、出血量の 2 倍量の生理的食塩水を 1ml/分の速度で経静脈投与を行って蘇生を行った。蘇生後 180 分にわたって動物の状態を観察した。循環動態に関しては分担研究者堀之内がその変化について検討し、自己血注入群と HbV 注入群の間で変化を認めないことを明らかにしている。

実験開始時と脱血によりショックを惹起した後 30 分、60 分、90 分、180 分後に 500 μ l の採血を行い、血漿を分離し -80 度で凍結保存しサイトカインの測定に供した。採血直後に 1ml の生食を静脈より投与し、循環血液量が減少することによる影響を補正した。

サイトカインの測定は Birad 社製 Bio-Plex サスペンションレイシステムを用いて測定した(早稲田大学 理工総研 酒井 宏水 助教授、小幡洋輔氏の協力)。このシステムにより 100 μ l の試料を用いる

ことにより IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α の測定が可能である。

実験終了後に過量のペントバルビタールを用いて犠牲死させ、開腹して注入した血液あるいは人工血液の状態を確認した。

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. 結果および考察

1. 生存

すべての動物はショック、蘇生、経過観察中生存し、死亡した動物はなかった。

2. サイトカインの変化(Fig. 1)

IL-1 α

IL-1 α は 3200pg/ml までの範囲で測定が可能であるが、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以下の値を呈した。

IL-1 β

IL-1 β は 3200pg/dl までの範囲で測定が可能であるが、自己血注入群、HbV 注入群で Fig.1 のように低値ないしは測定限界以下の値をとっていた。また、両群間に有意差は認めなかった。

IL-2

IL-2 も 3200pg/dl までの測定が可能である。自己血注入群では実験開始時 97 \pm 43pg/dl であったが、ショック蘇生後 30 分で 53 \pm 24pg/dl まで減少した後 60 分後 84 \pm 21pg/dl、90 分後 79 \pm 27pg/dl、180 分後 84 \pm 48pg/dl と実験開始時に戻る傾向が認められた。

HbV 注入群でも実験開始時には 67 \pm 31pg/dl であったが、ショック蘇生後 30 分では 35 \pm 30.4pg/dl と減少し、60 分では 58 \pm 39pg/dl、90 分では 50.3

±28pg/dl、180分では57±34pg/dlと実験開始時の値に戻る傾向が認められた。両群間でいずれの時点でも有意差を認めなかった。

IL-4

IL-4の測定上限も3200pg/dlに設定されているが、実験開始時の1サンプルと自己血注入群の中でショック蘇生180分後の1つのサンプルのみ非常に低い値が検出されたのみでその他の試料では測定限界の下限以下の値をとった。

IL-6

IL-6も3200pg/dlまでの測定が可能となっていたが、測定試料すべてで測定下限以下の値をとっていた。

IL-10

IL-10も3200pg/dlまでの測定が可能であった。自己血注入群では実験開始時0.4±0.6pg/dlと非常に低値を取っており、ショック蘇生30分後には0.8±0.5pg/dl、60分後2.9±3.3pg/dl、90分後5.1±10pg/dl、180分後は37±44pg/dlと上昇した。一方HbV注入群でも実験開始時1.9±2.5pg/dlであったが、ショック蘇生30分後には0.4±0.6pg/dl、60分後1.1±2.0pg/dl、90分後3.4±4.8pg/dl、180分後11.1±19.6pg/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。

GM-CSF

GM-CSFの測定も3200pg/dlを上限とした設定となっていた。GM-CSFは実験開始時に2.8±3.9pg/dlであったが、自己血注入群ではショック蘇生30分後には1.5±1.9pg/ml、60分後には0.15±1.9pg/dl、90分後には1.2±1.7pg/dlに減少し、180分後に6.4±8.2pg/dlに上昇した。HbV注入群ではショック蘇生30分後に1.1±2.4pg/dl、60分後1.5±2.9pg/dl、90分後0.3±0.4pg/dlまで減少し、180分後には2.1

±3.1pg/dlまで回復した。

Interferon γ

IFN- γ は自己血注入群、HbV注入群の測定試料すべてで感度以下の値をとり、変動はなかった。

TNF- α

TNF- α は3200pg/dlまでの測定が可能となっていた。実験開始時には6.4±6.5pg/dlと非常に低い値をとっていた。自己血注入群ではショック蘇生30分後に8.6±7.0pg/dlと実験開始時とほぼ同等の値を示し、その後60分後に8.8±5.7pg/dl、90分後12.6±9.1pg/dl、180分後24.3±23.3pg/dlと上昇が認められた。一方HbV注入群では実験開始時10.7±7.7pg/dlと若干高い値を示していたが、ショック蘇生30分後に4.3±6.7pg/dlと低下を認め、60分後には7.4±7.1pg、90分後には6.7±3.8pg/dlと若干の上昇を認め、180分後に10.2±6.0pg/dlと実験開始と同等の値に復した。

いずれの時点でも両群間に有意差を認めなかった。

D. 考察

生体の分化、増殖、恒常性維持の目的で、細胞間において様々な情報交換が行われている。特に免疫系における細胞情報交換を行う主要な液性因子がサイトカインである。

侵襲に対する生体反応としてTNF- α 、IL1- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8などを中心とする炎症性サイトカインが産生される。しかし一方でこれらの炎症性サイトカインに拮抗するIL-4、IL-1ra、IL-10などの抗炎症性サイトカインも産生される。生体の損傷に起因する炎症にかかわるサイトカインは炎症の進展、消退とともにその産生量をコントロールしている。急性肺傷害(Acute Lung Injury,ALI)やSIRSに代表される炎症性疾患はこの機序が破壊されて炎症反応が亢進した状態と考えられている。

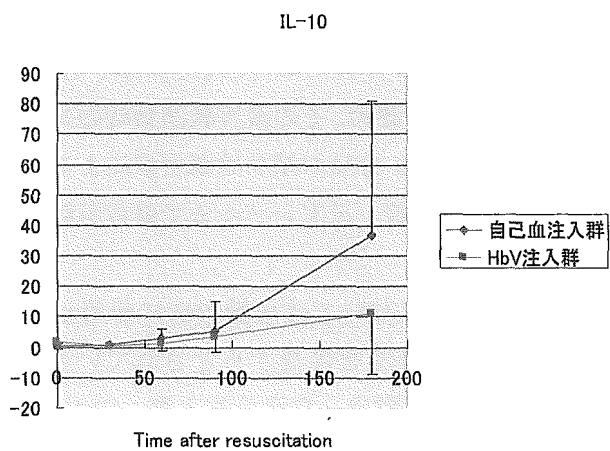
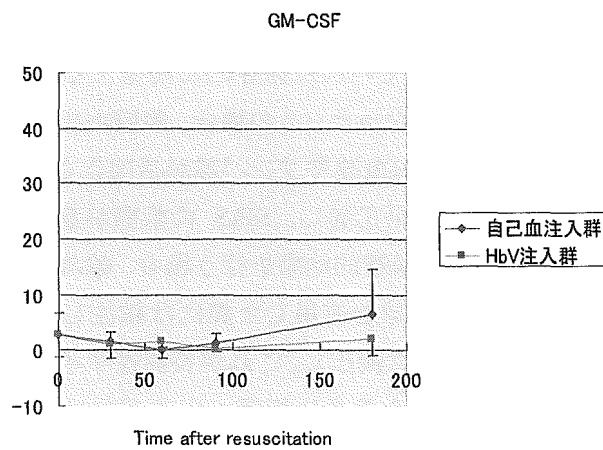
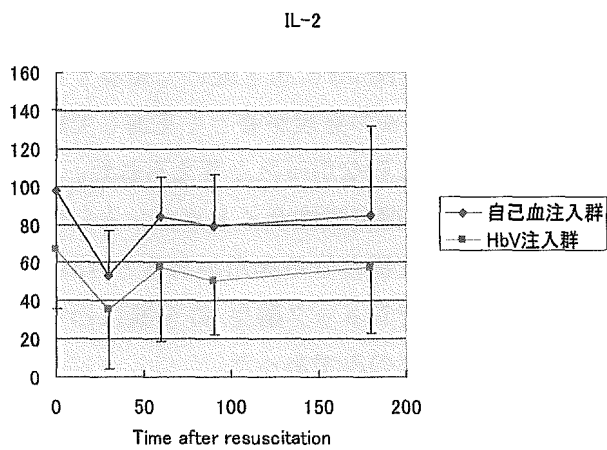
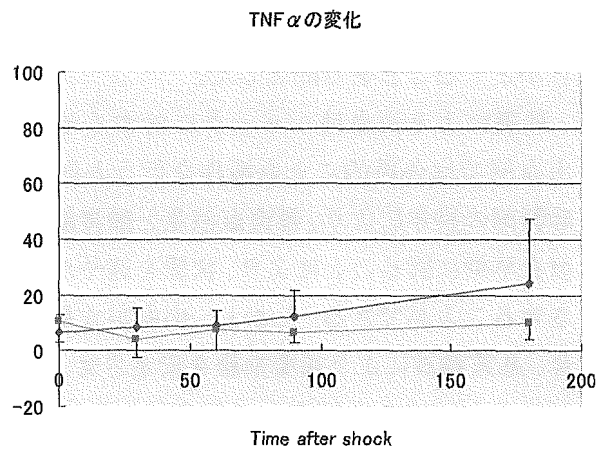
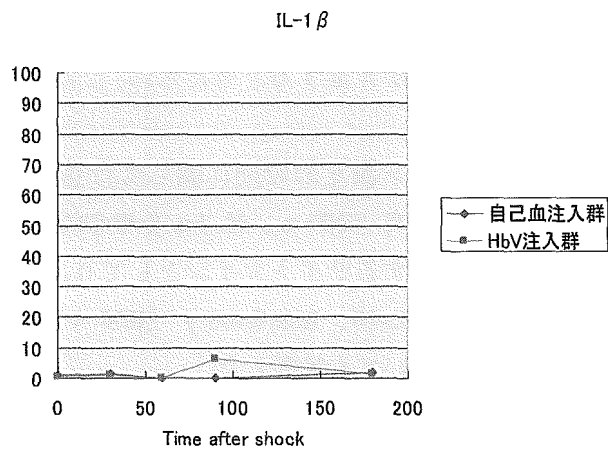


Fig.1. Plasma cytokine levels (pg/ml).

人工赤血球として開発された HbV は、赤血球を模倣した構造を持ち、動物への投与では種々のモデルを通じ急性期、慢性期において安全に使用できることが明らかになってきた。急性期反応物質としてのサイトカインの変動についても解明されつつある。本研究は実際に臨床応用された場合を想定し、鈍的腹部外傷での HbV 使用の安全性を明らかとすることを目的とした。

外傷による出血性ショックに対する治療は大量出血例では外科的に止血操作を行うと同時に赤血球製剤の投与により、循環血液量と酸素輸送能の回復を早期に図ることにより、状態を速やかに安定化させることができる。しかし、出血が大量でない場合、晶質輸液により循環動態を安定させ、出血で失われた血液成分を補充して保存的に治療を行うことも多い。特に鈍的腹部外傷による肝・脾損傷では腹腔内出血量を腹部超音波所見を参考にしながら状態が安定していれば保存的に治療する方法がとられるようになった。この場合、腹腔内出血や臓器損傷により、白血球やリンパ球が活性化され、サイトカイン産生が亢進し、SIRS の状態が惹起されることがある。保存的治療を行う場合、輸血の代替として人工赤血球を使用した際には輸注した人工赤血球が腹腔内に流出し、これが炎症性サイトカイン産生を促し蘇生効果に影響が出る可能性が考えられた。このため動物に於いて出血性ショック状態をモデル化し、腹腔内に血液あるいは人工赤血球を注入することによって免疫担当細胞などからのサイトカイン産生に影響を及ぼすか否かについて知ることは臨床現場での使用に当たって重要な検討事項であると考えられた。今回は腹腔内に自己血あるいは HbV 分散液を注入することによってサイトカイン産生がどのように変化するかについて検討した。

モデルとしては無処置の動物に腹腔内投与を行うことも考慮されたが、臨床では臓器損傷に伴う出血が起こることを鑑み、出血性ショック動物に投与することとした。臓器損傷は安定したモデルを動物

で得ることが困難なことから、臓器損傷による臓器特異的な反応を可能な限り少なくするために、単純な腹腔内投与による影響を検討した。

循環血液量の 30%相当の出血性ショックでは十分な晶質液による蘇生により死亡にいたることはないが、動物によっては血圧の維持が十分行われないう状態となる。このような状態では、炎症性サイトカインの産生が亢進すると考えられ、このモデルを選定した。

サイトカイン測定の時期に関しては急性期サイトカインとして TNF- α 、IL-1 α をやや時間を置いて産生が亢進するサイトカインとして IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、Interferon γ (IFN- γ) さらに GM-CSF についても検討した。

その結果急性期炎症性サイトカインに分類される IL-1 α は自己血注入群、HbV 注入群のすべての検体で感度以下の値を示し、亢進は認められなかった。IL-1 α は TNF- α に引き続いて発現するサイトカインで TNF- α の発現が著しく亢進していないため、発現が起こらなかったと考えられた。

IL-1 β も急性期炎症性サイトカインとして機能し、血管透過性を亢進させる作用があるとされている。自己血注入群でショック蘇生 60 分後にわずかに発現が認められたのみであった。

IL-2 は T 細胞、NK 細胞、CTL 細胞より産生され、単球、マクロファージを活性化させる。発現は比較的緩徐で実験時間中の変動はないと予想されたが、ショック蘇生 30 分後には自己血注入群、HbV 注入群ともに減少を認め、その後実験開始時のレベルに復した。蘇生 30 分後の減少は蘇生液による希釈が考えられ、その後、正常レベルまで発現が起こったと考えられた。

IL-4 は炎症においては血管内皮に作用してリンパ球や単球の接着を促進するとされている。IL-4 は今回の実験期間中、自己血注入群、HbV 注入群の双方で発現を認めなかった。発現細胞はリンパ球、マスト細胞、好塩基球などであるがこれらの細胞の活性化がなかったと考えられる。

IL-6 は単核球、マクロファージ、血管内皮細胞、など多くの細胞で産生され、惹起されると上昇する炎症性サイトカインで、抗体産生を増強し、急性期蛋白の産生にもかかわっている。慢性の炎症（慢性関節リウマチなど）で上昇していることが知られている。今回の測定で発現を認めなかったのは出血と腹腔内投与が強い炎症を惹起しなかったためと考えられた。

IL-10 は抗炎症性サイトカインに分類され、マクロファージの T 細胞活性化を抑制し、マクロファージからの IL-1 の産生も抑制する。

今回の実験では自己血注入群でショック蘇生後上昇しているのが認められ、抗炎症機序が働いていることが伺われた。

GM-CSF は好中球や単球の分化を促進し、炎症反応を促進する。今回の検討では GM-CSF の発現は測定感度の加減近くで計測された。ショック蘇生 90 分後まで自己血注入群も HbV 注入群も明らかな変化はなく、180 分後に自己血注入群でわずかな上昇を認めた。自己血の中には白血球やリンパ球が混在しており、これらの細胞成分からのサイトカインの発現が認められた可能性もあると考えられた。

TNF- α は急性期の炎症で上昇する代表的な蛋白でマクロファージ、T リンパ球から産生される。その発現は非常に鋭敏で、急性期に発現細胞上に分布している蛋白が切り離されて分泌されると考えられている。実験開始時には低値を取ることが予想され、測定でも検出限界の下限近くの値を呈した。ショック蘇生 30 分後ではその発現レベルは自己血注入群で若干上昇したが、明らかな上昇とは考えられなかった。その後自己血注入群では緩やかに上昇し、180 分後には実験開始時の約 4 倍の 24.32pg/dl の値をとった。この値も明らかな炎症が認められる際に測定される 1000pg/dl オーダーの発現には及ばず、わずかな炎症が認められるレベルと考えられた。今回のモデルでは、出血、腹腔内注入共に無菌操作で行われており、明らかな炎症を惹起するモデルとは異なっていたためと考えられる。自己血注入群では

注入した自己血の中にリンパ球、単球が含まれており、これらが腹腔内で TNF- α を産生し、血中の値に反映された可能性もあると考えられた。HbV 注入群では実験開始後よりほとんど増減はなく、腹腔内へ流出しても TNF- α 産生に影響を及ぼすものではないことが明らかとなった。

IFN- γ はウイルスに感染した細胞が産生する炎症性サイトカインで、免疫担当細胞に働きその活性を増強する。今回の検討では自己血注入群、HbV 注入群のすべての検体で測定下限以下の値を呈し、変化を認めなかった。HbV の粒径は小さく、貪食細胞に鈍食される際にサイトカインが産生される可能性があったが、腹腔内投与ではこのような現象は起こらないことが明らかとなった。

以上のように炎症の少ない状況で行った実験ではあったが、出血性ショック後に腹腔内投与を行っても HbV はサイトカイン産生に影響をほとんど及ぼさず、腹腔内出血を伴う臨床例での安全性が示唆された。

E. 結論

ラットを用いて 30%脱血による出血性ショック直後に腹腔内に自己血、HbV 分散液を投与してサイトカイン産生の変動を検討した。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α について測定を行い、臨床的に問題となるような強い発現を認めず、腹腔内出血を伴う臨床例での安全に使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. N. Aikawa, S. Kohno, K. Shibuya, Y. Takesue, S. Maesaki, M. Yoshida, I. Tokimatsu. Current status of diagnosis and treatment of invasive fungal infections

- in Japan: the influence of the new Japanese guidelines. *J. Infect. Chemother.* **11**, 278-87 (2005).
2. S. Inoue, S. Hori, T. Adachi, K. Miyazaki, S. Kyotani, K. Fukuda, H. Mori, H. Nakazawa, N. Aikawa, S. Ogawa. Flow-independent myocardial ischemia induced by endothelin-1: an NADH fluorescence analysis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **46**, 810-6 (2005).
 3. S. Wakino, S. Hori, T. Mimura, S. Fujishima, K. Hayashi, H. Inamoto, T. Saruta, N. Aikawa. Heat stroke with multiple organ failure treated with cold hemodialysis and cold continuous hemodiafiltration: a case report. *Ther. Apher. Dial.* **9**, 423-8 (2005).
 4. S. Wakino, S. Hori, T. Mimura, S. Miyatake, S. Fujishima, N. Aikawa. A case of severe heat stroke with abnormal cardiac findings. *Int. Heart J.* **46**, 543-50 (2005).
 5. N. Aikawa, S. Fujishima, S. Endo, I. Sekine, K. Kogawa, Y. Yamamoto, S. Kushimoto, H. Yukioka, N. Kato, K. Totsuka, K. Kikuchi, T. Ikeda, K. Ikeda, K. Harada, S. Satomura. Multicenter prospective study of procalcitonin as an indicator of sepsis. *J. Infect. Chemother.* **11**, 152-9 (2005).
 6. M. Suzuki, N. Aikawa, K. Kobayashi, R. Higuchi. Prognostic implications of inhalation injury in burn patients in Tokyo. *Burns.* **31**, 331-6 (2005).
 7. 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**, 237-41 (2005). Review.
 8. K. Kobayashi, H. Ikeda, R. Higuchi, M. Nozaki, Y. Yamamoto, M. Urabe, S. Shimazaki, A. Sugamata, N. Aikawa, N. Ninomiya, H. Sakurai, Y. Hamabe, N. Yahagi, H. Nakazawa. Epidemiological and outcome characteristics of major burns in Tokyo. *Burns.* **31** Suppl 1, S3-S11 (2005).
2. 学会発表
1. 葉季久雄、藤島清太郎、関根和彦、佐々木淳一、堀進悟、相川直樹／マウス sepsis モデルにおける Th2 ケモカインの体内動態／第 33 回日本救急医学会総会／2005.10.26-28／さいたま市
 2. N. Aikawa／Antibodies and other humoral agents in the treatment of infection. / The 41st World Congress of Surgery of ISS/SIC / 2005.8.21-25 / Durban, South Africa
 3. 石川秀樹、北野光秀、山崎元靖、葉季久雄、船曳知弘、一二三亨、鈴木昌、堀進悟、相川直樹／IIIb(AP)+HVr 型肝損傷に対する肺右葉切除術／第 19 回日本外傷学会／2005.5.26-27／横浜市

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
	山岸 正	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	研究員
	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(HbV)の心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果を検討した。HbV 原液(Hb として 10 g/dL 相当)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 HbV 分散液では、この結果は弱かった。これらの結果は、HbV 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(HbV)が有力な候補となっている。HbV 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、HbV 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検討した。

B. 研究方法

1. 実験試薬類

実験に用いた HbV(SN20041217, lot 6)、対照として用いた Hb を含有しない空球小胞体は、オキシジェニクス社が委託製造した。灌流液の作製のため

の電解質などの試薬類は、いずれも和光純薬の試薬特級を用いた。灌流液中の乳酸濃度の測定(後述の Lowry & Passonueau の方法)に使用した試薬は、いずれも Sigma (St Louis, MO)の試薬を用いた。水は比抵抗 18.2 MΩ 以下の超純水を用いた。

2. 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。

3. 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)、左室拡張末期圧(LVEDP)、心拍数(HR)などを実験開始から終了まで連続的に記録した。バルーンの容積は、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。冠灌流量(coronary flow, CF)の測定は、心臓を灌流して出てきた灌流液を、control 灌流時は 5 分毎に採取し、再灌流(reperfusion)の最初の 5 分間は 1 分間と 4 分間に分けて採取し、それ以降は 5 分毎に採取して、それぞれその volume を計測することで行った。

4. 灌流液中の乳酸濃度の測定

上記の操作で採取した灌流液は、よく攪拌して volume を測定した後、その 1 mL を採って直ちに氷冷した。こうして集めた全ての灌流液を 10,000g で 40 分間遠心分離し、その上清 0.6 mL を採って乳酸を測定するまで -80°C に保管した。灌流液中の乳酸濃度は、Lowry and Passonneau (1972)の方法に従って測定した。

5. Hb 小胞体と空球小胞体の KH-buffer への分散

(1) HbV 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 HbV 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、HbV 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 HbV 分散液の Hb 濃度は 0.33 g/dL 相当となる(30 倍希釈分散液)。

(2) HbV 100 倍希釈分散液

上述の方法で作製した HbV 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 HbV 分散液の Hb 濃度は 0.10 g/dL 相当となる(100 倍希釈分散液)。

(3) 空球小胞体希釈分散液の作製

供給された Hb を含有しない空球小胞体原液は、対応する HbV 原液と脂質濃度が等価であると考え、上で述べた HbV 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 HbV 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。

6. 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 5 群に分けて実験を行った。

(1) 対照群 (n = 6) : control 灌流を約 30 分間行った後に、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)。

(2) 空球小胞体 0.10 g/dL 群 (n = 7) :

(3) 空球小胞体 0.33 g/dL 群 (n = 7) :

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。

(4) HbV 0.10 g/dL 群 (n = 7) :

(5) HbV 0.10 g/dL 群 (n = 6) :

HbV 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。

7. データの計算と統計処理

全ての測定項目について、各実験群で測定した時間毎に平均値(mean)と標準偏差(SD)を計算した。統計処理は、各測定項目について、各実験群のすべてのデータを用いて、時系列分散分析を行い、その後各測定時間ごとに対照群(control)の平均値に対するその他の実験群の平均値の有意差をDannett 多重比較法で検定した。なお、以下で結果を図示するが、図が見にくくなるのを避けるため、標準偏差(SD)は省略した。

C. 研究結果

1. 心機能

(a) 冠灌流量(CF) (Fig. 1)

対照群(control)の冠灌流量は、control 灌流時に時間の経過と共に平均約 85 mL/5 min から 75 mL/5 min まで少しずつ低下した。再灌流開始後から冠灌流量は増加し始め、5-10 分にはほぼ control 灌流時の値に戻ったが、その後は低下した。HbV を含む 2 つの実験群では、それらを灌流した時の冠灌流量の低下が大きいように見えた。しかし、測定した全ての時間で、各実験群の冠灌流量と対照群(control)のそれとの間に有意の差はなかった。

(b) 心拍数(HR)(Fig. 2)

対照群(control)の心拍数は、control 灌流時には、平均約 260beats/min で推移した。一方、再灌流時には、再灌流開始後の 1 分と 10 分に各 1 例で拍動が見られたが、それ以外の時間には全例で拍動は観察されなかった。Control 灌流時および各小胞体分散液を灌流した時の各実験群の心拍数は対照群とほぼ同じに推移した。再灌流時には、2 つの空球小

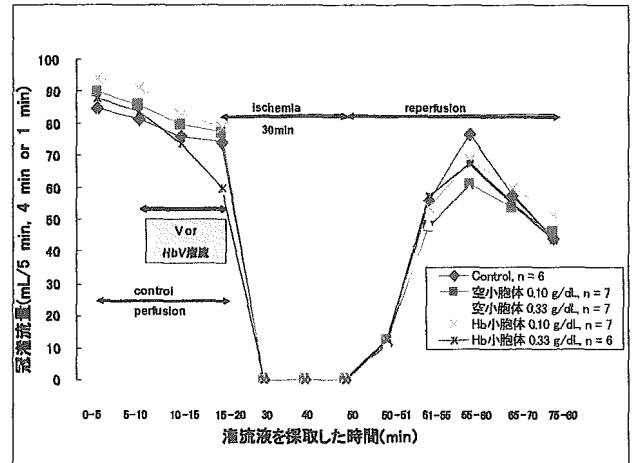


Fig. 1. 灌流速度の推移

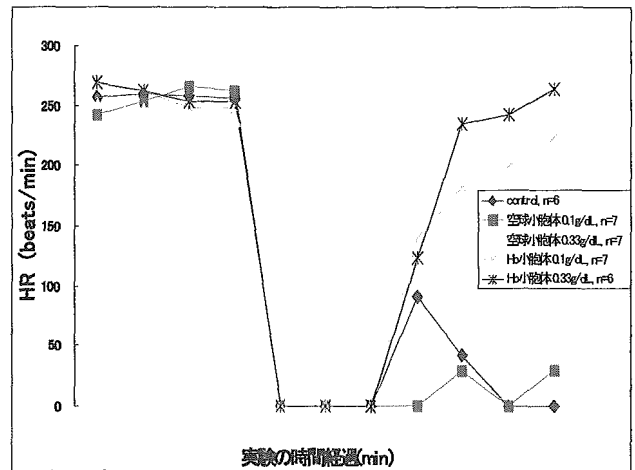


Fig. 2. 心拍数(HR)の推移

胞体群では有意の変化は見られなかったが、2 つの HbV 群の再灌流 10 分、20 分および 30 分後の心拍数の回復は対照群(control)のそれらと比較して有意に大きかった。

(c) 左室拡張末期圧(LVEDP)(Fig. 3)

対照群(control)の左室拡張末期圧(LVEDP)は、control 灌流時には、平均約 5 mmHg で推移した。この左室拡張末期圧は虚血時に上昇を開始し、虚血(30分)終了時には約 40 mmHg まで上昇した。再灌流を開始すると、さらに上昇し 1 分後には約 85 mmHg まで達し、その後実験が終了するまでこの水準で推移した。Control 灌流時および各小胞体分

散液を灌流した時の各実験群の左室拡張末期圧は対照群とほぼ同じに推移した。虚血終了時の2つのHbV群の左室拡張末期圧の上昇は対照群のそれと比較して低いようであったが、その差は有意ではなかった。再灌流時には、2つの空球小胞体群では対照群と同様の上昇が見られたが、2つのHbV群の再灌流1分、20分および30分後の左室拡張末期圧の上昇は対照群(control)のそれらと比較して有意に低かった。

(d) 左室発生圧(LVDP) (Fig. 4)

対照群(control)の左室発生圧(LVDP)は、control灌流時には時間の経過と共に、平均約175 mmHgから155 mmHgまでゆっくりと低下した。一方、再灌流時には、再灌流開始後の1分と10分に各1例で左室発生圧の発生が見られたが、それ以外の時間には全例で左室発生圧の発生は観察されなかった。再灌流時には、2つの空球小胞体群では有意な変化は見られなかったが、HbV0.33 g/dL群の再灌流1分と2つのHbV群の20分および30分後の左室発生圧の回復は対照群(control)のそれらと比較して有意に大きかった。

2. 灌流液中の乳酸濃度と乳酸遊離量

(a) 乳酸濃度 (Fig. 5)

対照群(control)の灌流液中の乳酸濃度は、control灌流時には時間の経過と共に、平均約10 µg/mLから18 µg/mLまでゆっくりと上昇した。一方、再灌流時には、再灌流開始後の1分には平均約250 µg/mLまで急激に増加した。その後は速やかに低下し、再灌流10分後には、control灌流時の値に近づいた。さらに灌流を続けると僅かではあるが濃度が再び上昇した。Control灌流時および空球小胞体分散液を灌流した時の各実験群の灌流液中の乳酸濃度は対照群とほぼ同じに推移した。一方、HbV分散液を灌流した時には、どちらの濃度の群でも灌流開始5分後の灌流液中の乳酸濃度が対照群に比べて有意に低い値となった。さらに再灌流開始1

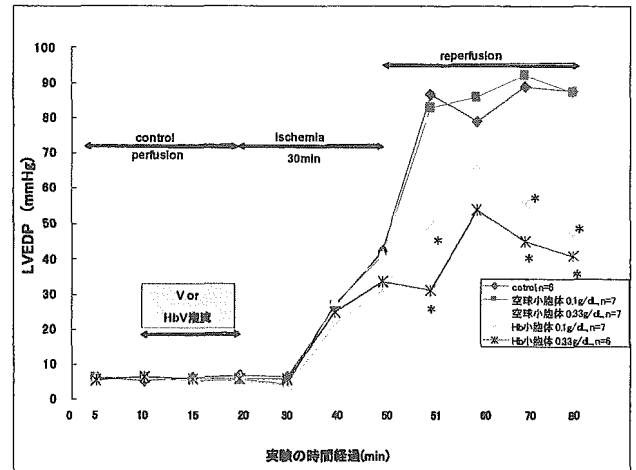


Fig. 3. 左室拡張末期圧(LVEDP)の推移

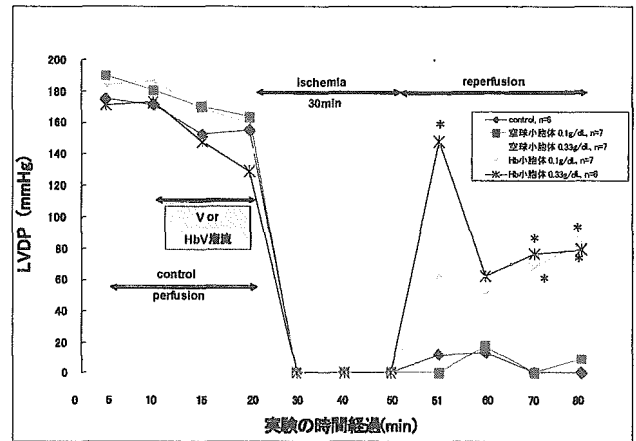


Fig. 4. 左室発生圧(LVDP)の推移

分後のHbV 0.33 g/dL群の灌流液中の乳酸濃度も対照群に比べて有意に低い値となった。

(b) 乳酸遊離量 (Fig. 6)

対照群(control)の灌流液中の乳酸遊離量は、control灌流時には時間の経過と共に、平均約800 µg/5 minから1200 µg/5 minまでゆっくりと上昇した。一方、再灌流時には、再灌流開始後の1分には平均約2700 µg/minまで急激に増加した。その後は速やかに低下し、再灌流10分後には、control灌流時の値より低くなった。さらに灌流を続けると僅かではあるが遊離量が再び上昇した。Control灌流時の各実験群の灌流液中の乳酸遊離量は、対照群のそれらと比較して差はなかった。空球小胞体

0.33 g/dL を灌流した時、灌流開始 5 分後の灌流液中の乳酸遊離量は対照群のそれと比べて有意の低値となった。また、HbV 0.10g/dL を灌流した時にも、灌流開始 5 分後の灌流液中の乳酸遊離量は対照群のそれと比べて有意に低い値となった。更に、HbV 0.33 g/dL を灌流した時には、灌流開始 5 分後と 10 分後の両方で灌流液中の乳酸遊離量は対照群のそれと比べて有意に低い値となった。再灌流後の乳酸遊離量では、HbV 0.33 g/dL 群の再灌流 10 分後の値は対照群のそれに比して有意に低く、30 分後の値は対照群のそれに比して有意に高くなった。

D. 考察

本実験では、HbV 原液を KH-buffer で希釈した分散液を、虚血を開始する前に 10 分間灌流すると、再灌流後に、含まれる Hb の濃度に依存した心機能の回復(心拍数と左室発生圧の回復、左室拡張末期圧の上昇抑制)が見られることが判明した。また、同時に測定した灌流液中の乳酸濃度では、HbV 分散液を灌流し始めた最初の 5 分と、再灌流直後 1 分間で、灌流液中の乳酸濃度の Hb の濃度に依存した低下が観察された。比較対照として用いた空球小胞体分散液では殆どこれらの効果が見られなかったため、これらの結果は、HbV が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。HbV による心機能の回復と灌流液中の乳酸濃度の低下の関係は、現段階では不明である。HbV によって運ばれる余分の酸素が、ミトコンドリアでの酸化を促進することで、乳酸の生成を抑えたのではなかろうかと推定されるが、このことが心機能の回復に繋がっているかどうかは、不明である。

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、HbV 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。HbV 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

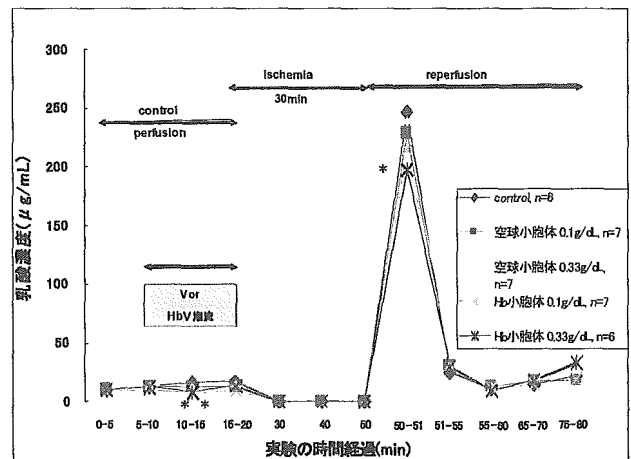


Fig. 5. 灌流液中の乳酸濃度の推移

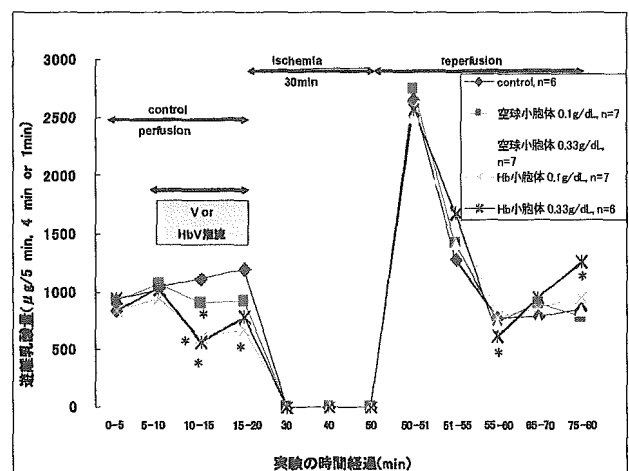


Fig. 6. 灌流液中の遊離乳酸量の推移

10 分間灌流し、30 分間の虚血を负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、灌流を開始した直後の 5 分間には灌流液中の乳酸濃度の低下が観察された。100 倍希釈した HbV 分散液では、これらの効果は弱かった。一方、空球小胞体を同様に希釈した分散液では、ほとんど効果は観察されなかった。これらの結果は、HbV 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。

F. 研究発表

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. R. Kato, Y. Momiyama, R. Ohmori, H. Taniguchi, H. Nakamura, F. Ohsuzu. Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circ. J.* **69**, 1035-1040 (2005)
2. R. Ohmori, Y. Momiyama, R. Kato, H. Taniguchi, M. Ogura, M. Ayaori, H. Nakamura, F. Ohsuzu. Associations between serum resistin levels and insulin resistance, inflammation, and coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 379-380 (2005)
3. Y. Momiyama, R. Ohmori, M. Nagano, R. Kato, H. Taniguchi, T. Egashira, H. Nakamura, F. Ohsuzu. Polymorphism of the 3'-untranslated region of interleukin-12 p40 gene is not associated with the presence or severity of coronary artery disease. *Circ. J.* **69**, 793-797(2005)
4. Y. Momiyama, R. Ohmori, R. Kato, H. Taniguchi, H. Nakamura, F. Ohsuzu. Lack of any association between persistent hepatitis B or C virus infection and coronary artery disease. *Atherosclerosis* **81**, 211-213 (2005)
5. R. Kato, Y. Momiyama, R. Ohmori, H. Taniguchi, H. Nakamura, F. Ohsuzu. Levels of matrix metalloproteinase-1 in patients with and without coronary artery disease and relation to complex and

noncomplex coronary plaques. *Am. J. Cardiol.* **95**, 90-92 (2005)

6. K. Ashida, K. Miyazaki, E. Takayama, H. Tsujimoto, M. Ayaori, T. Yakushiji, N. Iwamoto, A. Yonemura, K. Isoda, H. Mochizuki, H. Hiraide, M. Kusahara, F. Ohsuzu. Characterization of the expression of TLR2 (Toll-like Receptor 2) and TLR4 on circulating monocytes in coronary artery disease. *J. Atheroscler. Thromb.* **12**, 53-60 (2005)
7. H. Taniguchi, Y. Momiyama, R. Ohmori, A. Yonemura, T. Yamashita, S. Tamai, H. Nakamura, F. Ohsuzu. Associations of plasma C-reactive protein levels with the presence and extent of coronary stenosis in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* **178**, 173-177 (2005)

2. 学会発表

1. 加藤隆一、別所基明、浜御幸、山岸正、柳田茂樹、楠原正俊、大鈴文孝／ラット摘出心臓での虚血－再灌流障害に対するヘモグロビン小胞体の保護効果／第12回日本血液代替物学会年次大会／2005.6.6-7

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

昨年4月に米国への仮出願を終了し、現在、本報告の内容で、本出願申請を準備中である。

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：腹腔内出血を伴う出血性ショックに対する人工赤血球による蘇生効果

分担研究者 堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 講師
研究協力者 河野 光智 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助手

研究要旨

外傷による出血性ショックに対する治療は大量出血例では外科的に止血操作を行うと同時に赤血球製剤の投与により、循環血液量の回復と酸素輸送能の回復を早期に図ることにより、状態を速やかに安定化させることができる。しかし、鈍的腹部外傷による肝・脾損傷では状態が安定していれば保存的に治療する方法がとられることがある。保存的治療を行う場合、輸血の代替として人工赤血球を使用した際には輸注した人工赤血球が腹腔内に流出し、蘇生効果に影響が出る可能性が考えられた。ラットを用い出血性ショック状態をモデル化し、腹腔内に自己血あるいは Hb 小胞体(HbV)を注入することによって腹腔内出血と同様の状況を出現させ、ショックの蘇生効果に影響を及ぼすか否かについて循環動態の面から検討した。この結果、HbV は自己血群とほぼ同様の経過を示し、腹腔内出血合併例でも安全に投与できること考えられた。

A. 研究目的

外傷による出血性ショックに対する治療は大量出血例では外科的に止血操作を行うと同時に赤血球製剤の投与により、循環血液量の回復と酸素輸送能の回復を早期に図ることにより、状態を速やかに安定化させることができる。しかし、出血量が大量でない場合、晶質輸液により循環動態を安定させ、出血で失われた血液成分を補充して保存的に治療を行うことも多い。特に鈍的腹部外傷による肝・脾損傷では腹腔内出血量を腹部超音波所見を参考にしながら状態が安定していれば保存的に治療する方法がとられるようになった。この場合、腹腔内に出血した血液のうち血球成分は腸間膜のマクロファージや他の貪食細胞により捕捉され、細網内皮系で処理されて代謝され、血漿成分は腸間膜や腹膜より吸収されると考えられている。保存的治療を行う場合、輸血の代替として人工赤

血球を使用した際には、輸注した人工赤血球が腹腔内に流出し、蘇生効果に影響が出る可能性が考えられた。このため動物に於いて出血性ショック状態をモデル化し、腹腔内に血液あるいは人工赤血球を注入することが蘇生効果に及ぼす影響について知ることは臨床現場での使用に当たって重要な検討事項であると考えられた。

B. 研究方法

雄性 Wistar 系ラット (326~354 g, 約 8 週齢) を用い、セボフルレンによる吸入麻酔・自発呼吸下に右頸動脈および頸静脈にカテーテル (SP31 I.D.0.5 mm, O.D.0.8 mm 夏目社製) を留置、心電図をモニターし、保温装置を用いて体温を 37 度に保持しつつ実験を行った。頸動脈カテーテルは血圧の測定と脱血に用い、頸静脈より蘇生液を投与することとした。血圧、心拍数は、ポリグラフ

CH0011(日本光電社製)を用いて測定した。

動物の状態が安定した後、循環血液量の 30%の血液を 5 分間で脱血し、ショック状態を作成した。脱血量の決定にはラットの循環血液量を 56 ml/kg として計算した。脱血量は 5.30 ml~6.01 ml となった。脱血した血液には直ちにヘパリン 500 単位を加え、凝固を阻止し、自己血注入群では引き続き行う腹腔内投与のための自己血液とした。脱血終了 5 分後に 24G 針にて腹腔穿刺を行い、5 ml の自己血あるいは Hb 小胞体 (HbV) 生食分散液を注入した。HbV は Oxygenix 社が製造し、Hb 濃度 10 g/dl として生理的食塩水に分散した試料を用いた。ショック状態を 30 分維持した後、出血量の 2 倍量の生理的食塩水を 1 ml/分の速度で経静脈投与を行って蘇生を行った。蘇生後 180 分にわたって経時的に循環動態を測定し、血液あるいは人工赤血球が腹腔内に存在することの影響を測定した。実験終了後に過量のペントバルビタールを用いて犠牲死させ、開腹して注入した血液あるいは HbV の状態を確認した。

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

1. 生存

すべての動物はショック、蘇生、経過観察中生存し、死亡した動物はなかった。

2. 血圧、心拍数の変化 (Fig. 1)

蘇生液投与直前までの血圧の変化は、実験開始時自己血注入群で 86.2 ± 7.6 mmHg、HbV 注入群で 90.4 ± 11.5 mmHg、脱血直後に自己血注入群では 32 ± 3.1 mmHg、HbV 注入群では 39.8 ± 12.6 mmHg と自己血群、HbV 腹腔内投与群ともに有意差なく安定した出血性ショックモデルが形成されていた。心拍数は実験開始時自己血注入群で 357 ± 70 / 分、HbV 注入群で 358 ± 8 / 分であり、脱血直後も自己血注入群で 319 ± 19 / 分、HbV 注入群で 321 ± 27 / 分と有意差を認めなかった。

腹腔内投与直後の血圧は、自己血注入群で 38.6 ± 7.2 mmHg、HbV 注入群で 43.6 ± 5.2 mmHg と 2 群間に有意差はなく、ショック直後と比較しても有意差を認めなかった。心拍数は若干減少して自己血注入群で 312 ± 64 / 分、HbV 注入群で 285 ± 50 / 分であった。両群間に有意差はなく、これはショック直後と比較しても有意差を認めなかった。

30 分のショック状態の後に生理的食塩水による蘇生を行った。蘇生直前の状態は血圧が若干上昇し、末梢血管が収縮することにより血管床が減少して血圧が上がったことが考えられた。この現象

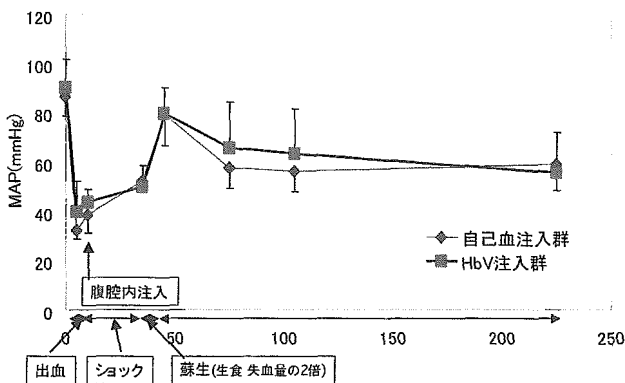


Fig. 1. Change of Mean Arterial Pressure of autologous blood i.p. group: ◆ and HbV i.p. group: ■. There are no significant differences between two groups at any timepoint.

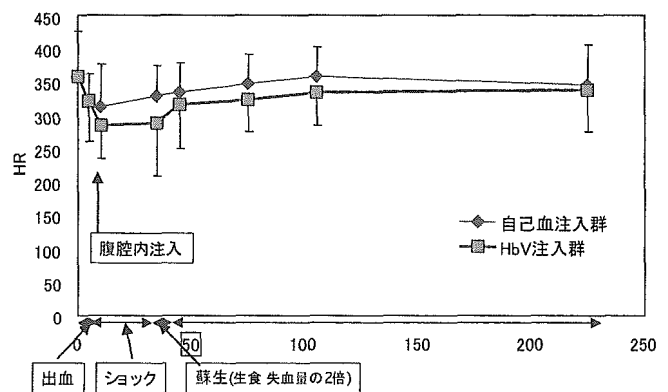


Fig. 2. Change of Heart Rate of autologous blood i.p. group: ◆, and HbV i.p. group ■. There are no significant differences between two groups at any timepoint.

は自己血注入群、HbV 注入群双方で同様に認められ、有意差を認めなかった。心拍数は自己血注入群では回復を認めたが、HbV 注入群では腹腔内投与後と変化がなかった。しかし、両群間には有意差を認めていない。

蘇生直後の血圧は自己血注入群で 79.2 ± 12.6 mmHg、HbV 注入群で 79.6 ± 10.6 mmHg であり、ほとんど同じ結果であった。また、心拍数も自己血注入群で 333 ± 46 / 分、HbV 注入群で 316 ± 66 / 分であり、有意差は認めなかった。

蘇生後の経過も Fig. 1,2 のように生理的食塩水による蘇生では長時間の血圧の維持は困難で徐々に血圧が低下することが認められたが、この低下は自己血注入群、HbV 注入群で同様の経過を呈し、2群間に有意差を認めなかった。心拍数も、両群ともに同様の推移を示し有意差を認めなかった。

以上の所見より出血性ショックの状態では HbV が腹腔内出血に混じる形で存在しても循環動態には大きな影響を与えるということはなく、腹腔内出血を有する患者でも安全に使用できることが考えられた。

D. 考察

人工赤血球による出血性ショックの蘇生に際し評価を行なう際、分子状の修飾 Hb の投与では血管壁より漏出、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。HbV では粒径が 250 nm と血管外には流出しないサイズで調整されている。このため、HbV が血管外に漏出した際に有害事象が起こるか否かはについて検討することが課題として挙げられていた。

血管の破綻による出血性ショックの治療では外科的に止血を行い、大量の晶質液や輸血によって蘇生を行うことが原則であるが、腹部鈍的外傷による実質臓器損傷においては保存的に出血が沈静化するのを待つ治療法がとられることも多い。

このような状況下で、輸血の代替として人工赤血球を投与すると、輸注した人工赤血球も腹腔内に出血とともに流出することが予想される。この問題を解決するため、腹腔内に流出した人工赤血球がショック状態の生体にどのような影響を与えるかについてラットの循環血液量の 30% を脱血したショックモデルを用い評価した。

脱血した血液あるいは生食分散した HbV を出血性ショック状態とした動物の腹腔内に注入し、血圧、心拍数の変化を測定した。出血性ショック状態は中等度のモデルを選定した。臨床でも血圧の維持できない大量出血を伴う腹部臓器損傷では外科治療による止血が先行するが、腹腔内出血が多くなく、血圧が輸液により安定する症例に限って経過観察を行っているので、動物試験を行う際も出血性ショックとしては中等度のモデルを選んで実験を行った。

その結果、30%脱血した出血性ショックモデルは安定したショック状態を作成することができた。また、自己血あるいは HbV 分散液をショック作成 5 分後に腹腔内に投与したが、ショック状態に明らかな変化をきたさず、その後のショック蘇生、ショック蘇生後の経過にも大きな変化をきたさなかった。

以上から、HbV は腹腔内に流出することがあっても循環動態に影響を与えることは少なく、臨床で、腹腔内臓器損傷の症例に安全に投与できる可能性が示唆された。今後、生化学的影響、サイトカイン産生に対する影響、長期生存時の腹腔内臓器の癒着などへの影響などについて検討する必要があると思われる。

E. 結論

Wistar 系ラットを用いて 30%脱血による出血性ショックモデルを作成し、自己血、あるいは HbV 分散液を腹腔内に注入し、循環動態に与える影響を検討した。HbV 分散液は自己血注入群とほぼ同様の経過を示し、HbV が腹腔内に流出しても循環

動態に与える影響は少ないと考えられた。

F.健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 堀之内宏久, 泉陽太郎, 小林絃一, 土田英俊. 人工酸素運搬体の開発 現状と将来展望. *検査と技術*. **33**, 879-881 (2005)
2. 堀之内宏久, 藤本博之, 小林絃一. 診断の進歩, 細径気管支鏡. *Annual Review 呼吸器* **2005**. 152-155 (2005)
3. H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Acute 40% exchange transfusion with Hb-vesicles (HbV) suspended in recombinant HSA solution: Degradation of HbV and erythropoiesis in rat spleen observed for 2 Weeks. *Transfusion* **46**, 339-347 (2006).
4. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. One-year observation of Wistar rats after infusion of Hb-vesicles (Artificial oxygen carriers). *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* (2006) in press.

(総説、著書)

1. T. Komatsu, Y. Huang, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Albumin-heme: a synthetic heme-based oxygen carrier. In "Blood Substitutes" (Ed. By Robert M. Winslow, Elsevier), Chapt. 46, pp. 532-539 (2006).
2. E. Tsuchida, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative.

Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol. (2006), in press.

2. 学会発表

1. 堀之内宏久, 羽藤泰, 黒田浩章, 塚田紀理, 藤本博行, 山本学, 江口圭介, 泉陽太郎, 渡辺真純, 川村雅文, 小林絃一, 神谷一徳, 川久保雅祥 / 胸壁切除に対する再建症例の検討 胸壁再建症例は QOL が低下するか / 第 105 回日本外科学会総会 / 2005.4. / 名古屋
2. 堀之内宏久, 黒田浩章, 神谷一徳, 羽藤泰, 川久保雅祥, 塚田紀理, 藤本博行, 竹内健, 泉陽太郎, 江口圭介, 渡辺真純, 川村雅文, 小林絃一 / 再発肺がんに対する外科的治療 / 第 22 回日本呼吸器外科学会総会 / 2005. 5. / 京都
3. 堀之内宏久, 黒田浩章, 神谷一徳, 羽藤泰, 川久保雅祥, 藤本博行, 塚田紀理, 泉陽太郎, 江口圭介, 渡辺真純, 川村雅文, 澤藤誠, 小林絃一 / 食道癌気管浸潤に対するステント治療 / 第 28 回呼吸器内視鏡学会総会 / 2005. 5. / 東京
4. 澤藤誠, 副島研造, 中島隆裕, 堀之内宏久, 小林絃一 / 良性気道狭窄に対するステント療法 / 第 28 回呼吸器内視鏡学会総会 / 2005. 5. / 東京
5. 中山光男, 柴修吾, 福田祐樹, 堀口速史, 山畑健, 菊池功次, 堀之内宏久, 小林絃一 / 結核性気管気管支狭窄の治療 外科的切除とステント療法 / 第 28 回呼吸器内視鏡学会総会 / 2005. 5. / 東京
6. 酒井宏水, 宗慶太郎, 武岡真司, 堀之内宏久, 小林絃一, 土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)大量投与後の細網内皮系における代謝