

3. 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

A. 研究目的

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ことがある。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・代謝され、血漿成分は腸間膜や腹膜より吸収される。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。また、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可能性がある。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したのち Volume resuscitation を行い、蘇生効果に与える影響と免疫担当細胞からのサイトカイン産生の変動を検討することを目的とした。

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°C 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。測定は、血圧、心拍数をポリグラフ CH0011 (日本光電社製) を用いて測定した。脱血した血液のうち 0.3 ml を用い、末梢血液検査を施行した。

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 56ml/kg として計算した。脱血量は 5.3 ml~6.0 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、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製造し、Hb 濃度 10g/dl として生理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 分にわたって経時的に循環動態を測定し、血液あるいは HbV が腹腔内に存在することの影響を測定した。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。サイトカインの測定は Birad 社製 Bio-Plex サスペンションアレイシステムを用いて測定した。このシステムにより、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 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

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。

D. 考察

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

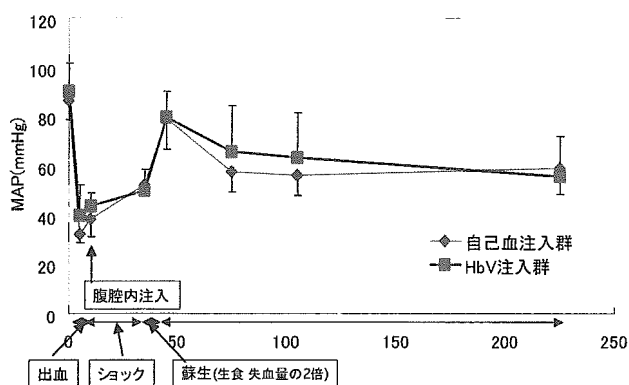


Fig. 1. Change of Mean Arterial Pressure of autologous blood i.p. group: \blacklozenge and HbV i.p. group: \blacksquare . There are no significant differences between two groups at any timepoint.

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。

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、循環動態およびサイトカイン産生に与える影響を検討した。HbV 注入群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く、炎症性サイトカインの過剰産生も認められず、HbV は腹腔内出血合併例でも安全に使用できると考えられた。

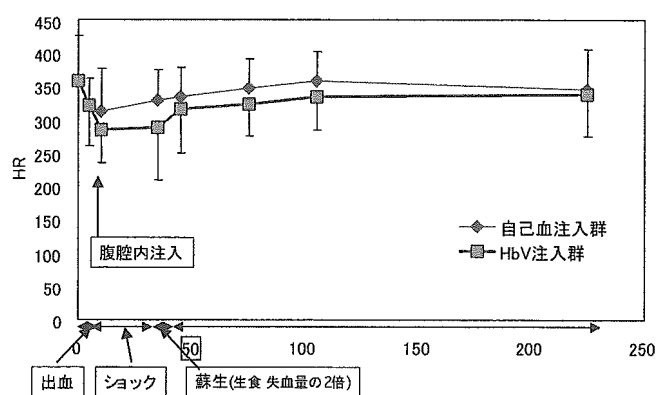


Fig. 2. Change of Heart Rate of autologous blood i.p. group: \blacklozenge , and HbV i.p. group \blacksquare . There are no significant differences between two groups at any timepoint.

4. ウサギ出血性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評価

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とし、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

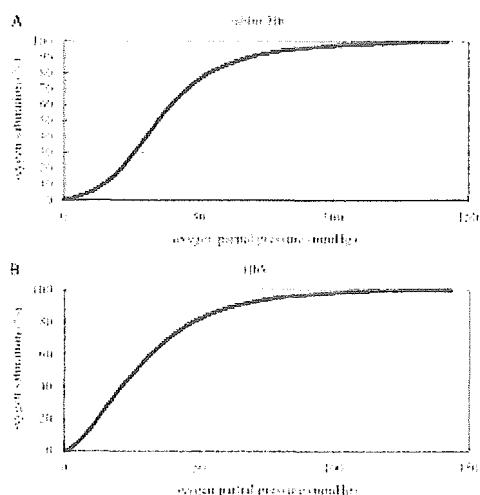


Fig. 1 ヘモックスアナライザーにより測定したウサギ赤血球 (A) と HbV (B) の酸素解離曲線

ニターに、もう一方は採血・脱血の為に使用した。小開頭・開腹により左大脳皮質・肝臓・腎皮質に、また鼠径部より 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・浸透圧測定の為に 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,

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/HSA	85 ± 10	33 ± 3*	43 ± 3*	80 ± 10	90 ± 16 [†]	90 ± 17 [†]	90 ± 7 [†]
rHSA	89 ± 11	32 ± 3*	36 ± 2*	68 ± 14	76 ± 9 [†]	77 ± 9	80 ± 9 [†]
RL	79 ± 10	34 ± 1*	41 ± 9*	69 ± 9	56 ± 13*	51 ± 10*	54 ± 20*
3 × RL	80 ± 17	31 ± 3*	36 ± 7*	67 ± 12	62 ± 17	46 ± 20*	46 ± 16*
CVP (mmHg)							
HbV/HSA	4.5 ± 1.2	3.0 ± 0.8*	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*	5.0 ± 1.7	4.8 ± 1.5	4.7 ± 0.5	4.2 ± 0.8
RL	6.2 ± 1.3	2.7 ± 0.8*	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	2.8 ± 1.0*	2.8 ± 1.2*	5.5 ± 0.8	4.8 ± 1.2	3.7 ± 0.5	2.8 ± 1.0*
CI (L · min⁻¹ · m⁻²)							
HbV/HSA	2.9 ± 0.7		1.2 ± 0.4*		2.9 ± 0.2 [†]	3.2 ± 0.8 [†]	2.6 ± 0.4 [†]
rHSA	2.7 ± 0.8		1.0 ± 0.2*		2.7 ± 0.7	2.3 ± 0.5 [†]	2.4 ± 0.6 [†]
RL	2.5 ± 0.9		1.1 ± 0.4*		1.8 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.3*
3 × RL	2.9 ± 0.5		1.1 ± 0.2*		2.6 ± 0.9	1.9 ± 0.6	1.4 ± 0.4*
SVR (dyne · s · cm⁻⁵)							
HbV/HSA	1,573 ± 730		1,899 ± 420		1,516 ± 294	1,498 ± 440	1,604 ± 288
rHSA	1,834 ± 494		1,956 ± 394		1,600 ± 566	1,820 ± 549	1,812 ± 655
RL	1,559 ± 564		2,012 ± 695		1,578 ± 509	1,993 ± 567	2,445 ± 1,036
3 × RL	1,575 ± 465		1,868 ± 370		1,374 ± 334	1,420 ± 717	1,848 ± 616

Animals were resuscitated using the same volume of HbV/HSA, 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/HSA	0.4 ± 1.5	-7.8 ± 2.8 [*]	3.3 ± 2.3	0.2 ± 2.6	0.9 ± 2.5 [†]
rHSA	0.3 ± 3.8	-8.4 ± 3.7 [*]	-6.7 ± 4.3 [*]	-0.9 ± 3.5	-0.7 ± 2.8
RL	0.9 ± 3.8	-7.7 ± 2.8 [*]	-6.2 ± 3.3 [*]	-4.2 ± 4.2 [*]	-5.7 ± 5.2 [*]
3 × RL	0.9 ± 2.2	8.4 ± 3.7 [*]	9.1 ± 8.3 [*]	8.9 ± 9.3 [*]	10.2 ± 9.1 [*]
Blood lactate (mg · dL⁻¹)					
HbV/HSA	29.2 ± 16.3	89.3 ± 28.8 [*]	51.0 ± 17.3 [†]	26.0 ± 11.5 [†]	25.7 ± 11.7 [†]
rHSA	25.2 ± 6.8	93.2 ± 44.4 [*]	67.7 ± 39.6 [*]	45.5 ± 25.5	41.2 ± 27.8
RL	33.0 ± 14.1	91.0 ± 16.6 [*]	79.7 ± 16.2 [*]	72.2 ± 24.6 [*]	81.5 ± 37.3 [*]
3 × RL	40.9 ± 27.5	103.8 ± 43.1 [*]	111.0 ± 37.2 [*]	94.8 ± 35.6 [*]	107.3 ± 37.8 [*]
Mixed venous blood oxygen saturation (%)					
HbV/HSA	68 ± 9	39 ± 8 [*]	62 ± 13	74 ± 11 [†]	66 ± 8 [†]
rHSA	67 ± 10	49 ± 10 [*]	58 ± 11	64 ± 5 [†]	63 ± 4 [†]
RL	71 ± 14	50 ± 14 [*]	51 ± 18	43 ± 12 [*]	39 ± 11 [*]
3 × RL	58 ± 9	38 ± 14 [*]	61 ± 23	45 ± 17 [*]	56 ± 25
Oxygen consumption (mL · min⁻¹ · m⁻²)					
HbV/HSA	148 ± 64	83 ± 29 [*]	154 ± 45 [†]	122 ± 21 [†]	148 ± 31 [†]
rHSA	124 ± 46	55 ± 19 [*]	103 ± 32	77 ± 9	94 ± 16
RL	113 ± 22	72 ± 36 [*]	97 ± 16	84 ± 6 [*]	79 ± 10 [*]
3 × RL	130 ± 55	82 ± 21 [*]	82 ± 23 [*]	106 ± 30	57 ± 27 [*]

Animals were resuscitated using the same volume of HbV/HSA, rHSA, or RL, or using 3 × RL, over 15 min. Observations were made 15 min (T4), 1 h (T5), and 2 h (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).

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(早稲田大学 理工学総合研究センターの協力)。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., Berkeley, California, USA)で行った。2 群間の比較は 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. 研究結果

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

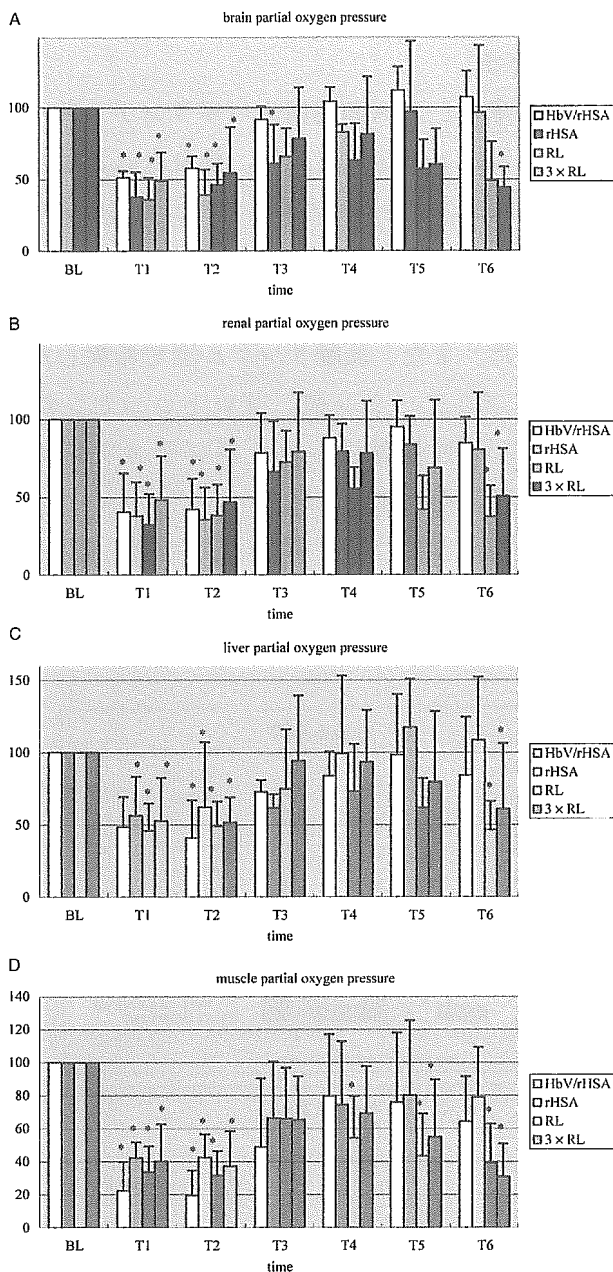


Fig. 2 臓器酸素分圧の変化. A 脳 B 腎臓
C 肝臓 D 骨格筋

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、乳酸リンゲ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、乳酸リンゲ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 溶液系ではその特性により、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。我々の研究では、等容量輸液蘇生による、その輸液剤への 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、50%相当の出血モデルにおいては、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を明らかにした。

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する、HbV の凝固系への影響は明らかではない。また、観察時間が蘇生後 2 時間までとしたのは、出血性ショック後より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血処置を行うということを想定した実験的モデルのためであった。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

価は微小電極で行われたため、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).

5. 人工赤血球溶液大量投与を想定したヒト全血に対する凝固機能への影響 -ソノクロット分析による検討-

A. 研究目的

出血性ショックに対する輸液蘇生の目的は、主要臓器の循環や酸素化を改善し維持することにある。しかし、大量の蘇生のための輸液は、時として凝固能の破綻から死亡率を増加させることとなる。これらは、出血源の処置されていない出血のコントロール出来ない場合や、救急現場における一時的な止血の困難な大量出血などが当てはまる。また、血漿増量輸液剤であるヒドロキシエチルスターチ製剤等は、大量投与により凝固機能の悪化を来すことが知られている。そこで、人工酸素運搬体である Hb 小胞体(HbV)溶液の凝固能に対する影響を知る必要がある。本研究では、出血の生じている患者に対する HbV 溶液の凝固能への影響から、投与限界を調査することを目的とした。

B. 研究方法

研究対象は、6人の健常人(ボランティア)から採血されたヒト全血とした。採血された血液を直ちに乳酸リンゲル液(LR群)、または、HbV溶液([Hb] = 10 g/dL, HbV群)で0%, 20%, 40%, 60%, 80%希釈した。この検体を、Sono-Clot analyzer®で直ちに解析した。また、乳酸リンゲル液で希釈した溶液のフィブリノーゲン値、プロトロンビン時間(PT-INR)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)をそれぞれ測定した。

B. 研究結果

Son-ACT(Sonoclot Activated Clotting Time; 活性化

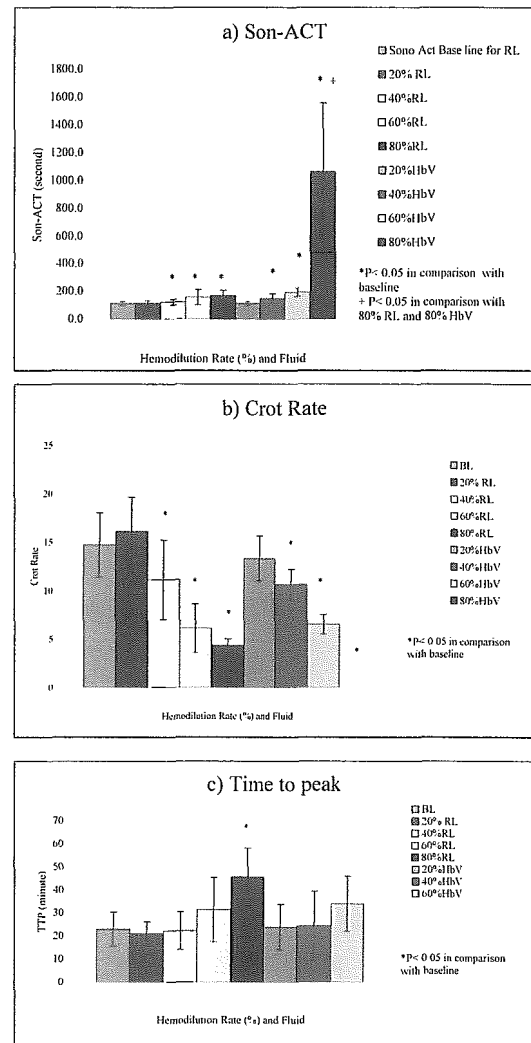


Fig. 3. 血液にHbVまたはリンゲル液を加えたときの凝固系への影響

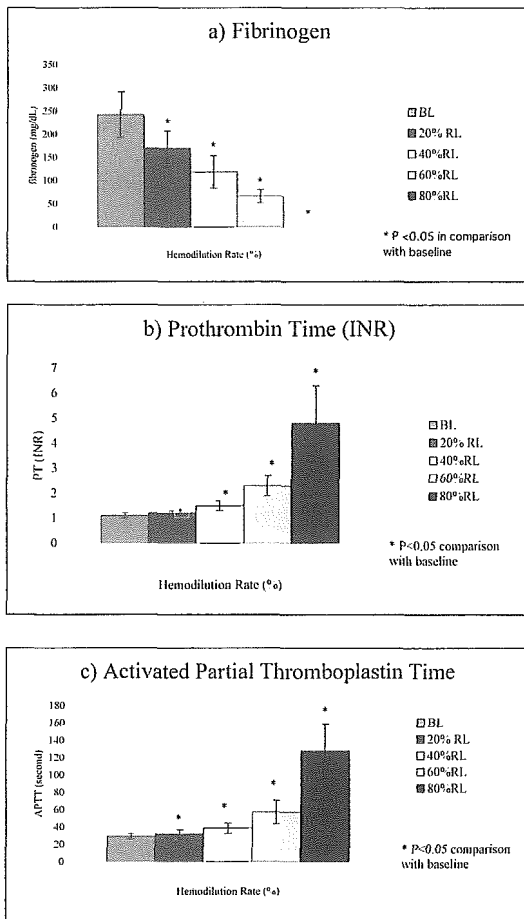


Fig. 4. 血液にリンゲル液を加えたときの凝固系への影響

凝固時間)は、20%、40%、60%希釈では、2群間に差はなかった。80%希釈において、HbV 群の方が有意に延長した。Clot rate (フィブリン塊形成の度合い)やtime to peak (血液の粘稠度がピーク値を示すまでの時間)も 20%、40%、60%希釈では、2群間に

差はなかった (Fig. 3)。フィブリンノーゲン値は希釈によって減少し、PT-INR や APTT は希釈によって延長した。(Fig. 4)

D. 考察

血液の 60-80%を HbV で希釈、または、置換した場合、Son-ACT は著しく延長する。また、ソノクロット分析では、HbV 溶液の 60%までの希釈では乳酸リンゲル液による希釈と変わらない結果となった。さらに、40%希釈まででは、Son-ACT や clot rate の値は正常範囲内であった。血管内に HbV 溶液が完全にとどまるような場合は、血管内の乳酸リンゲル液が血液を希釈する程度と同じ程度に全血の凝固機能を障害する。出血の可能性のある場合は、40%以下が安全であるかもしれない。

E. 結論

全血の凝固機能をソノクロット分析で評価したところ、60%希釈までは、HbV 溶液と乳酸リンゲル液で希釈した凝固機能は同等である。

F. 健康危険情報

該当なし。

6. 人工赤血球の脳虚血領域に及ぼす影響

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た。先ず、1) 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人工赤血球(Hb小胞体, HbV)の投与で脳梗塞域が異なるかを検討し、2) 次に、慢性ラットモデルで同様の検討を行った。更に、慢性ラットモデルで縮小効果が認められなかったため、3) 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、NO供与体である硝酸イソソルビド ISDN (isosorbide dinitrate)を併用して検討した。

B. 研究方法

1. 急性期の検討

対象は雄性のSDラット(n=16)(体重:350~400g)とした。基礎麻酔としてUrethan 600mg/kgと α -Chloralose 60mg/kgの混合液の腹腔内投与を行い、気管切開後、気管内チューブを挿入し空気下に人工呼吸管理を開始した。呼気炭酸ガス濃度を30~35mmHgに維持した。平均動脈圧測定、採血及び薬剤投与目的に両側大腿動静脈にカテーテルを留置した。ラットは投与製剤により無作為に2つのグループに分けられた。グループ1としてHbVを5%リコンビナントアルブミン(rHSA)に分散させた溶液による血液交換(HbV群)、グループ2としてrHSA溶液による血液交換(rHSA群)とした(各々、

n=8)。麻酔維持はラットの心拍数を指標とし、420bpm/min以上となったらUrethan 600mg/kgと α -Chloralose 60mg/kgの混合液を0.5mlずつ30分間隔で追加投与した。また、皮膚切開時には1%Lidocaineによる局所麻酔も併用した。カニューレーション終了後、それぞれの製剤10mlを大腿静脈より投与し、循環血液量過負荷とならないように同時に大腿動脈より10mlの脱血を10分間で行った。血液交換量はラットの循環血液量を50ml/kgと想定し、約50%の血漿交換を行うものと仮定した。脳虚血モデルの作成法はLongaらのモデルに準じて行った。左外頸動脈の分枝を結紮後、切離した左外頸動脈より左内頸動脈方向へ、加工した4-0エチロン糸を挿入し、左頭頂葉に留置したドップラー血流計を指標とし、血液交換後、循環動態が安定した時点で、左中大脳動脈を閉塞した。ドップラー血流計で脳血流量が6unit以下までの低下を目標とした。2時間後、4-0エチロン糸を抜去し灌流した。再灌流30分後にラットを断頭し、TTC染色を行い、脳梗塞領域を確認した。脳梗塞領域は画像解析ソフトを用いて全ての容積を加算した。脳梗塞出現組織はホルマリン固定後、後日HE染色を行った。

(倫理面への配慮)基礎麻酔としてUrethan 600mg/kgと α -Chloralose 60mg/kgの混合液の腹腔内投与を行い、麻酔維持はラットの心拍数を指標とし、420bpm/min以上となったらUrethan 600mg/kgと α -Chloralose 60mg/kgの混合液を0.5mlずつ30分間隔で追加投与した。また、皮膚切開時には1%Lidocaineによる局所麻酔も併用した。処置中はPancronium 0.01mg/kg/minを持続投与し、循環動態より麻酔深度が十分であることを確認のうえ、断頭して安楽死とした。

2. 慢性期の検討

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50mg/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%rHSA 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。

脳虚血モデルの作成は Longa らのモデルに準じて行った。左外頸動脈の分枝を結紮した後、切離した左外頸動脈より左内頸動脈方向へ、加工した 4-0 エチレン糸を挿入し、左頭頂葉に留置したドップラー血流計を指標とし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、急性実験では再灌流 30 分後に、慢性実験では覚醒後 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

1. 急性期の検討

採血所見による血液交換前後のデータ(平均±SD)は、HbV 群で pH: 7.32→7.34、PaO₂ (mmHg): 118±16→104±36、PaCO₂ (mmHg): 44±6→41±6、Hb (g/dl): 18±2→11±1、Ht (%): 45±8→23±5、BS (mg/dl): 111±19 であった。rHSA 群では pH: 7.36→7.40、PaO₂ (mmHg): 107±13→85±18、PaCO₂ (mmHg): 43±11→38±4、Hb (g/dl): 16±3→8±1、Ht (%): 39±6→23±4、Blood Sugar (mg/dl): 93±12 であった。血液交換前後の循環動態が安定した時点でのそれぞれの値は、HbV 群で平均動脈圧 (mmHg) が 108±21→80±17、心拍数 (bpm/min) が

420±29→399±35、血漿交換後の脳血流量(unit)は 16.1±2.1 であった。左中大脳動脈閉塞後の脳血流量 (unit)は 6.1±1.6 まで低下した。rHSA 群では平均動脈圧(mmHg)が 114±19→99±22、心拍数 (bpm/min)が 404±52→422±30、血液交換後の脳血流量(unit)は 16.5±2.8 であった。左中大脳動脈閉塞後の脳血流量(unit)は 6.1±1.6 まで低下した。TTC 溶液による染色の結果、非染色部位 (梗塞領域) は、HbV 群で 4 例に、rHSA 群で 6 例に認められた。画像解析ソフトを用いた梗塞容積(mm³)は、HbV 群で 36.5±38.5、rHSA 群では 95.7±55.4 であった。

Table 1 血液置換前後の血液検査結果

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

2. 慢性期の検討

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 (Table 1)。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+Neo 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+Neo 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加するとすれば、物性値を改良した人工赤血球を

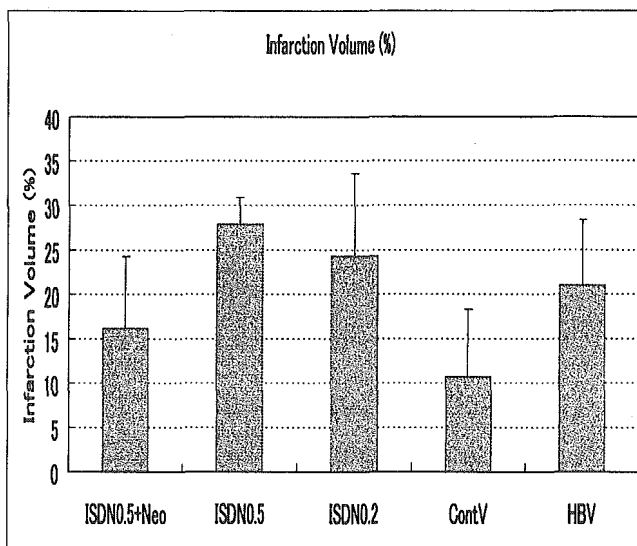


Fig. 1 各処置群の梗塞巣領域 (%)

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

7. Hb 小胞体の心筋虚血－灌流障害に対する保護効果

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効果をもたらすかを検討した。

B. 研究方法

1) 用いた試薬類

実験に用いた HbV はおよび対照として用いた空球小胞体は、オキシジェニクスが委託製造した試薬を用いた。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。灌流液中の乳酸濃度の測定には、いずれも Sigma (St Louis, MO)の試薬を用いた。水は比抵抗 18.2 M Ω 以下の超純水を用いた。

2) 用いた動物と心臓灌流法

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 11.0 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(control)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

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 の 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 の 100 倍希釈分散液

上で作製した 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

供給された空球小胞体原液は、対応する HbV 原液と等価であると考え、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) 実験のプロトコール

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 0.33 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 Dantett 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

はじめに、この研究の初期に行った実験の対照群、空球小胞体 0.33 g/dL 群および HbV 0.33 g/dL 群の典型例各 1 例を示して、虚血-再灌流時の心機能の推移を示す。

1) 心機能の推移(Fig. 1)

(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 0.33 g/dL 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) HbV 0.33 g/dL 群 (Fig. 1-C)

虚血を導入する前に、HbV 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。

これらの実験結果から、HbV が心筋の虚血-再灌流障害に対する何らかの保護効果を持っていると推定されたので、実験を継続し、各実験群の例数を増やし、統計処理を行って、以下のような結果を得た。

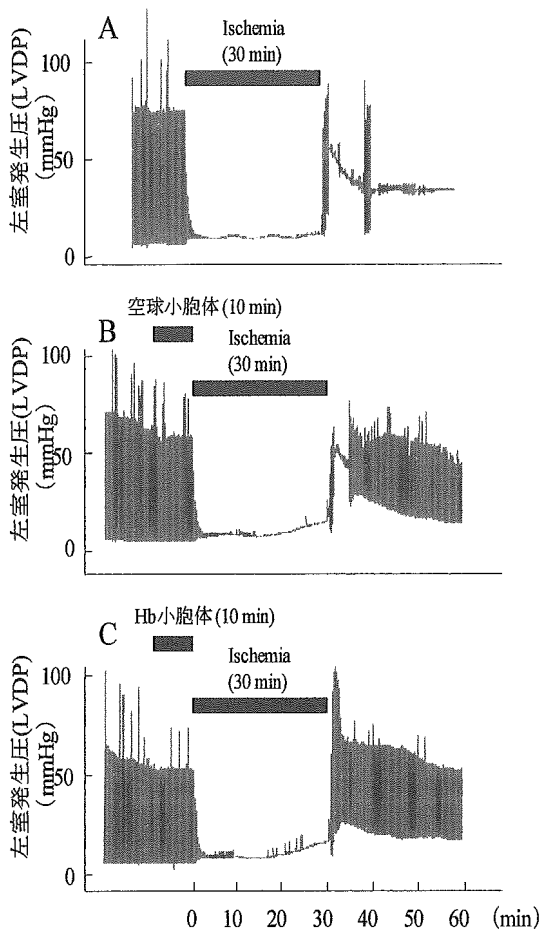


Fig.1 Representative recordings of left ventricular developed pressure (LVDP) in three experimental groups.

A: 对照群、B: 空球小胞体 0.33g/dL 群、
C: HbV 0.33g/dL 群

2) 心機能のまとめ

(a) 冠灌流量(CF)(Fig. 2)

对照群(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对照群(control)のそれとの間に有意の差はなかった。

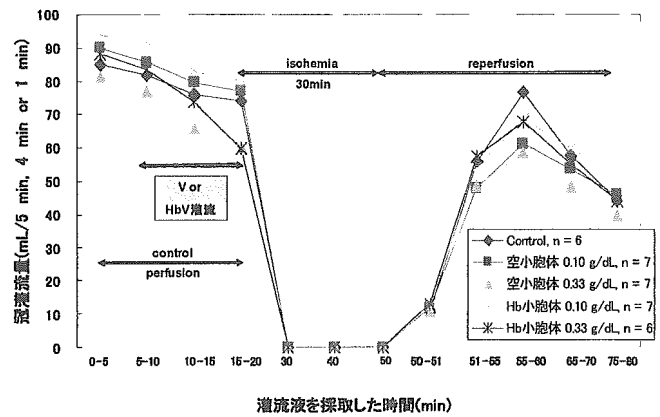


Fig. 2 冠灌流量の推移

(b) 心拍数 (HR) (Fig. 3)

对照群(control)の心拍数は、control 灌流時には、平均約 260 beats/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对照群とほぼ同じに推移した。再灌流時には、2 つの空球小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对照群(control)のそれらと比較して有意に大きかった。

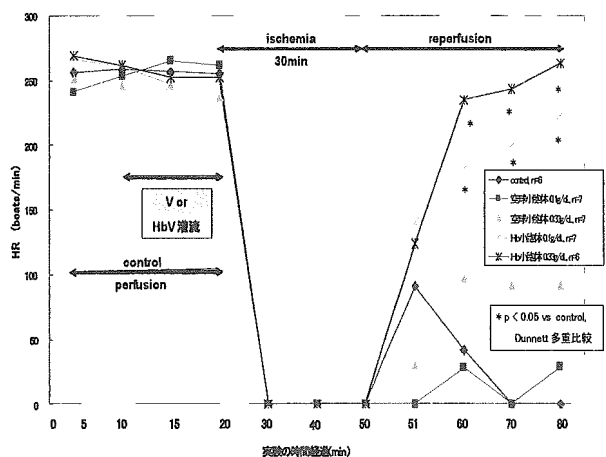


Fig. 3 心拍数の推移

(c) 左室拡張末期圧(LVEDP)(Fig. 4)

对照群(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。

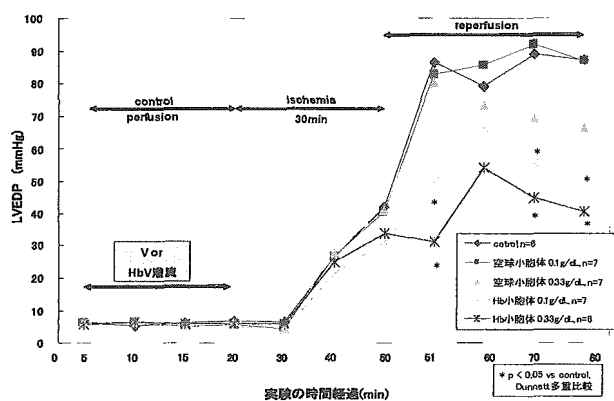


Fig. 4 左室拡張末期圧(LVEDP)の推移

(d) 左室発生圧(LVDP)(Fig. 5)

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の変化は見られなかったが、HbV 0.33 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。

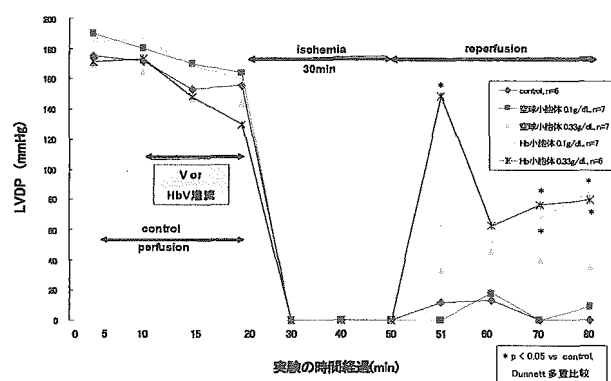


Fig. 5 左室発生圧(LVDP)の推移

3) 灌流液中の乳酸濃度と乳酸遊離量

(a) 乳酸濃度(Fig. 6)

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 $\mu\text{g/mL}$ から 18 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 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。

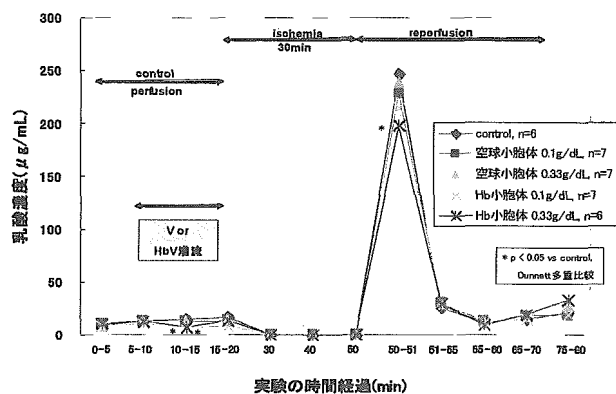


Fig. 6 灌流液中の乳酸濃度の推移

(b) 乳酸遊離量(Fig. 7)

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 $\mu\text{g}/5 \text{ min}$ から 1200 $\mu\text{g}/5 \text{ min}$ 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 $\mu\text{g}/5 \text{ min}$ 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の低値となった。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の低値となった。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。

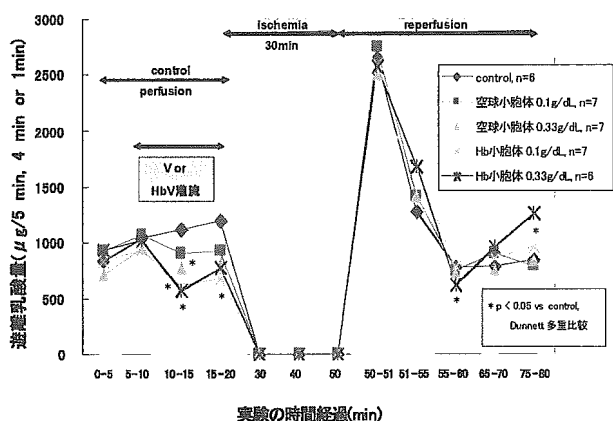


Fig. 7 灌流液中の遊離乳酸量の推移

D. 考察

以上に示した実験で、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ほとん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ら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 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、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. 健康危険情報

該当なし

8. モデル微小血管内を流動する Hb 小胞体とその酸素放出挙動の解析

A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)が酸素透過性を持つモデル微小血管(内径約28 μ m)を流動する際の酸素放出挙動を分光学的に数値解析し、赤血球およびHb溶液と比較してその特徴を明らかにすることを目的とした。本研究は、前田信治教授(愛媛大学医学部 生理第二教室)との共同研究として推進した。

B. 研究方法

Ethylene propylene co-polymer 製(平河ヒューテック社, 内径 28.1, 28.6 μ m, 壁厚 37.5 μ m) チューブを観察ホルダに設置し、試料混合液を灌流し酸素飽和度を測定した。チューブは酸素吸収剤として亜ニチオン酸ナトリウム溶液(20 mM)に浸して密閉した。酸素飽和度測定には USP-410 分光器を用いた(島津製, 測定波長: 500 - 600 nm, 0.2 nm 間隔)。赤血球の流速測定には 2 点光電法を用いた。観察部位は、酸素吸収剤チェンバー内に入ってから距離 1.5, 3, 5, 8, 10 cm とした。流速は 1mm/s になるように灌流圧(リザーバー空気圧)を調節した。

酸素飽和度の測定は、管内赤血球流動により吸光度の偏差が大きいため、また HbV の光散乱により短波長側で吸光度が増大することが問題となったので、各条件における測定を 10 回程度実施して

積算、更に各波長前後 5 点(例えば 500 nm を中心に 499.6, 499.8, 500, 500.2, 500.4 nm) の値の平均からスペクトルを得た。赤血球の oxy 型と deoxy 型のスペクトルをもとに、等吸収点(522, 586 nm)を直線で結びベースラインとし、555 nm と 576 nm の吸光度から検量線を作成した(第 1 回目実験の検量線作成法を改めた)。HbV は光散乱の影響が大きく、赤血球用の酸素飽和度測定プログラムでは酸素飽和度が正確に得られないことが判明した。しかし定常的な透過光が得られているため、吸光度の偏差は赤血球に比較して小さかった。

(測定試料)

RBC: suspended in 5 g/dl HSA, [Hb] = 10 g/dl, Hct = 29 - 33.3%, P_{50} = 28 mmHg

HbV_{HSA}: suspended in 5 g/dl HSA, [Hb] = 10 g/dl, P_{50} = 28 mmHg

HbV_{HES}: suspended in HES, Mw. 40kDa (Kyorin), [Hb] = 10g/dl, P_{50} = 28 mmHg

Hb₂₉: Hb/PLP = 1/3 by mol, [Hb] = 10 g/dL, P_{50} = 29 mmHg

Hb₁₅: Hb/PLP = 1/1 by mol, [Hb] = 10 g/dL, P_{50} = 15 mmHg

赤血球との混合比は、Hb/RBC (vol/vol) = 0/100, 10/90, 50/50, 90/10, 100/0 とした。

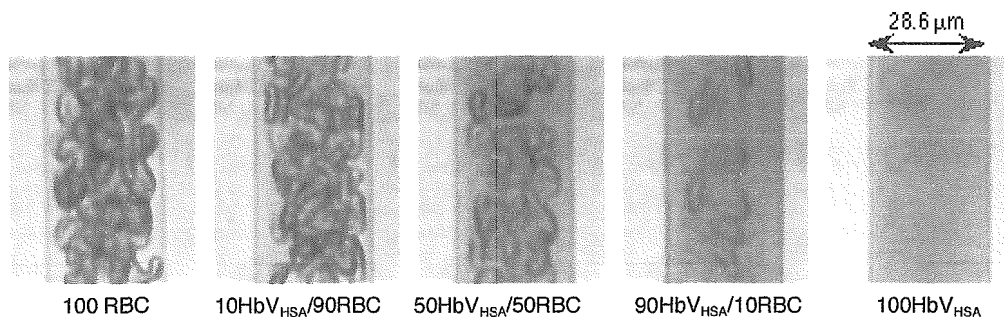


Fig. 1. Flow patterns of HbV_{HSA}/RBC mixtures in a narrow tube. HbV particles were homogeneously dispersed in a suspension medium. They tended to distribute in the marginal zone of the flow. The thickness of the RBC-free layer increased with the increasing amount of HbV_{HSA}. The RBC-free phase becomes darker and more semitransparent, indicating the presence of HbV. Diameter of the tube = 28 μ m; [Hb] = 10 g/dL; centerline flow velocity = 1 mm/s.

C. 結果および考察

1. 細管内の流動状態

HbV_{HSA} の混合比が大きくなるに従い、血漿相が増大し赤血球が管の中心側を流れるようになる (Fig. 1)。また HbV は粒子の形状は不明であるが、粒子が血漿相に均一分散して流れている様子が解った。

2. 細管流動の灌流圧

各混合比で流速を 1 mm/s に設定するために灌流圧を調節したところ、HbV_{HSA} の混合比の増大に従い、直線的に灌流圧が増大した (Fig. 2)。これは HbV_{HSA} の場合は粘度が 3-4 cP の均一分散溶液であるが、赤血球が流動する場合は、管の内壁近傍には粘度が 1 cP 程度の血漿層のみが存在し、中心側の赤血球富裕層の流動に際し潤滑剤の役割を果しているためとも考えられる。また、血漿増量剤に HES を用いると、更に灌流圧の増大を認めた。低粘度の Hb 溶液を混合した場合、灌流圧は赤血球に混合すると逆に低下した。

3. 酸素放出挙動

酸素飽和度の推移を測定したところ、赤血球溶液では直線的に減少が観測され、流路を 10cm 移動したところで飽和度は約 60% に低下した (Fig. 3)。他方、HbV の場合もこれと同等で、血液と混合した場合も混合比率に関係なく同等の変化が観測された。ストップフロー法による酸素放出速度の測定では、希薄溶液の測定であり血液と比較して約一桁大きい速度を示したが (Sakai et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1999;276:H553-H562)、今回 10g/dL の高濃度系での酸素放出を試みたところ、血液と同等の酸素放出挙動を示した。一般的に、小動脈または細動脈内で酸素供給が過剰となる場合、血管収縮が生起することが知られており、修飾 Hb 溶液系の投与で認められる血管収縮が、血管弛緩因子である NO の捕捉に起因するとの説だけでなく、酸素放出の促進作用に起因するとの説

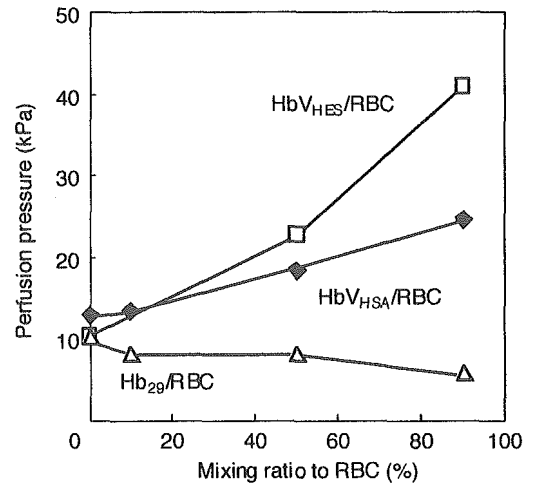


Fig. 2. Perfusion pressure of the HbV_{HSA}/RBC, HbV_{HES}/RBC and HbV₂₉/RBC mixtures ([Hb] = 10 g/dL) flowing in the narrow tube with the centerline flow velocity of 1 mm/s.

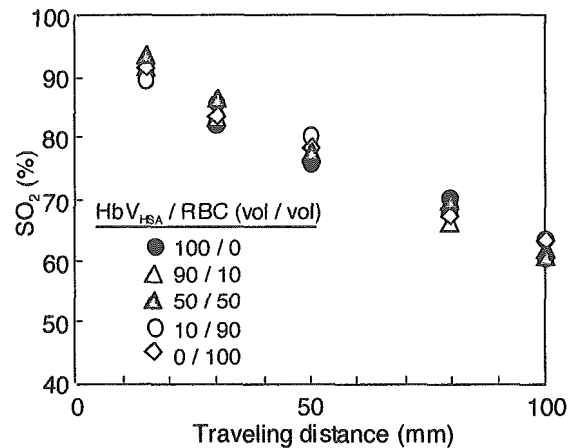


Fig. 3. O₂-release from the HbV_{HSA}/RBC mixture for various mixing ratios determined at various traveling distances.

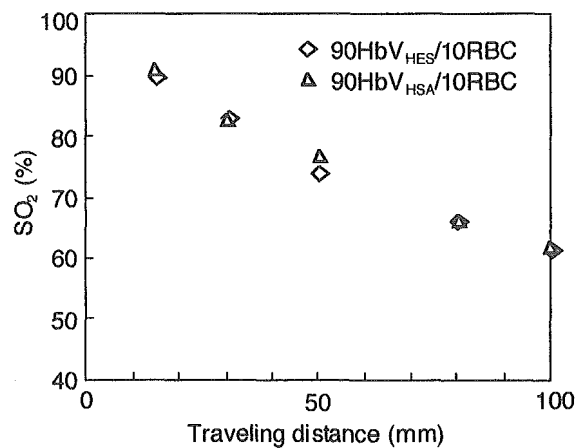


Fig. 4. Effect of suspending media on the O₂-release from HbV/RBC mixture; comparison of 90HbV_{HSA}/10RBC and 90HbV_{HES}/10RBC determined at various traveling distances.

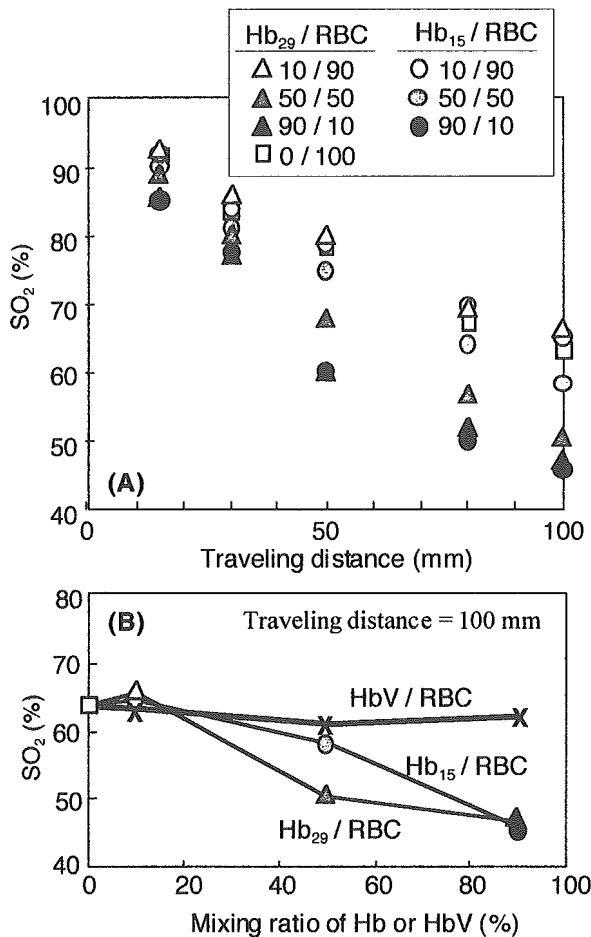


Fig. 5. (A) Effect of oxygen affinity on the O₂-release from the Hb/RBC mixtures at various traveling distances: comparison of Hb₂₉/RBC and Hb₁₅/RBC of various mixing ratios. (B) Effect of the mixing ratio, Hb/RBC and HbV/RBC, on the O₂ saturation: data from (A) for Hb/RBC and from Fig. 5 for HbV/RBC at the traveling distance of 100 mm.

がある。HbV の場合はこのような血管収縮を生起しないが、HbV の酸素放出速度が赤血球と同等である事実からも説明できる。

HbV の外水相の血漿増量剤を HES と HSA で比較した場合、HbV_{HES} 系の粘度が高いため(8 cP 程度、HbV_{HSA} は 3-4cP 程度)、灌流圧の大きな違いとなって現れた。しかし一定流速の条件では両者に酸素放出速度の相違は無かった (Fig. 4)。一定流速とすることで粘度の効果が低下したものと考えられる。

Hb 溶液を赤血球に 10vol%混合しても酸素放出速度には違いは殆ど見られなかったが (Fig. 5)、50vol%添加すると Hb₂₉ (Hb/PLP=1/3)の場合に特に

顕著に放出速度が速くなった。90vol%添加すると PLP の量に依らず、酸素放出速度は著しく速くなり、10cm 流れたところで酸素飽和度は 46%に到達した。Hb 溶液では HbO₂ 自体の拡散により、酸素の促進輸送効果を示したものと考えられる。他方、HbV の酸素放出速度は、赤血球と同等であった。HbV の粒子が大きいため促進輸送の効果は無かったと考えられる。

D. 結論

HbV の酸素放出速度は、モデル血管内(内径 25μm)では赤血球と同等であり、混合比にも依存しなかった。しかし、Hb 溶液は、赤血球との混合比に応じて酸素放出速度が増大した。Hb 溶液では HbO₂ 自体の拡散により、酸素の促進輸送効果を示したものと考えられる。

9. Hb 小胞体の末梢組織における酸素放出挙動の解析

A. 研究目的

虚血(低酸素)状態に陥った組織に対し、修飾 Hb(非細胞型)の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、実態は Hb 分子単独では充分量の酸素輸送が出来ないことが明らかにされて来ている。他方、Hb 小胞体(HbV)が有茎皮弁の虚血領域の酸素化に有効であることが Erni ら (Inselspital Univ. Hospital, Bern)と早稲田の共同研究により明らかにされてきた (Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003;285: H1140-H1147)。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検討を目的とし、今回は HbV 投与後に、細動脈血流を停止させた後の酸素分圧の変動から、HbV 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)と早大試料を対

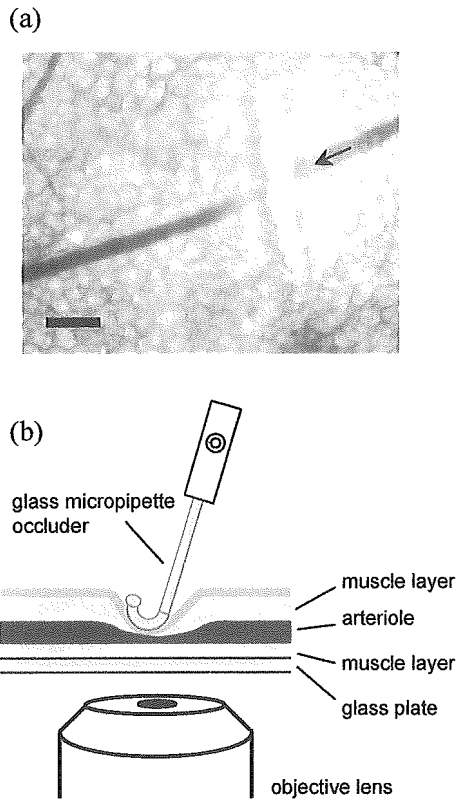


Fig. 6. (a) Microscopic image of an occluded arteriole in the hamster window chamber. The glass fiber lies across the arteriole. Scale bar, 100 μm . (b) Schematic representation of occlusion of (a) showing the different tissue layers of the skin (Not to scale).

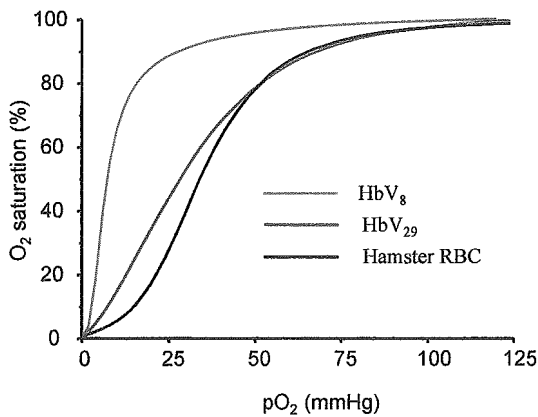


Fig. 7 Oxygen equilibrium curves (OECs) of HbV₈ and HbV₂₉ measured with a Hemox Analyzer (TCS Medical Products) at 37 °C in comparison with hamster blood.

象とし共同研究として実施された。

B. 研究方法

Hamster dorsal skinfold window model を利用し、

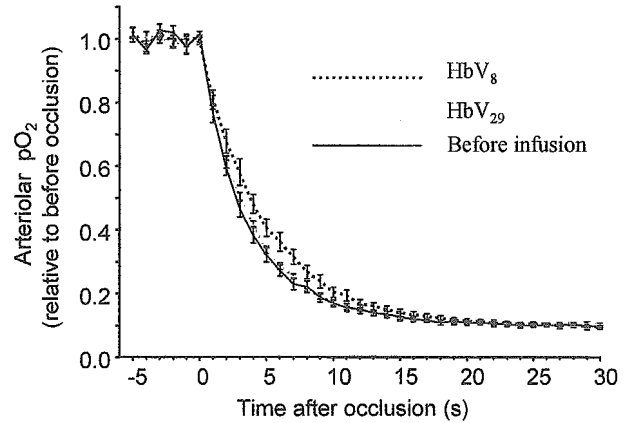


Fig. 8. Time course of the pO₂ (relative to the baseline values) in the blood of an occluded arteriole (diameter, 53.0 \pm 6.6 μm) before and after infusion of 7 mL/kg HbV₈ or HbV₂₉ into hamsters. Measurements were made in blood at a distance of 50 μm from the point of occlusion. There was a significant difference between the HbV₈ infusion and before infusion groups only at 7 sec ($p = 0.035$).

皮下微小循環を観測部位とした。血管内酸素分圧の測定には、Pd-coproporphyrin/アルブミン複合体を予め投与し、その燐光寿命から算出した。生理食塩水に分散された HbV([Hb] = 10 g/dL)を 7 mL/kg 投与した。顕微鏡下に細動脈(直径約 50 μm)を硝子製の微細ピペットで 30 秒間経皮的に圧迫して血流を停止させ、その 100 μm 下流域の血管内酸素分圧の変化を追跡した(Fig. 6)。HbV の酸素結合平衡曲線より酸素飽和度の推移を算出した。HbV は、高酸素親和度($P_{50} = 8$ mmHg, HbV₈)、および低酸素親和度($P_{50} = 29$ mmHg, HbV₂₉)の二種類について検討した(Fig. 7)。

C. 結果および考察

細動脈内の酸素分圧は平常 50 – 52 mmHg であるが、血流停止させると直ちに酸素分圧は低下し、最終的に 5 mmHg に到達した。Fig. 8 には、血流停止する前の値を 1.0 とした時の変化率を示した。HbV₈を投与した場合は、変化率は HbV₂₉を投与した場合と比較して僅かに遅延された。また、酸素飽和度の推移から算出した血中酸素含量の変化を Fig. 9a に、更にその HbV が寄与している酸素含量を Fig. 9b に示した。また酸素放出速度を Fig. 9c に示した。Fig. 8 より、血流停止後 10 秒経過すると

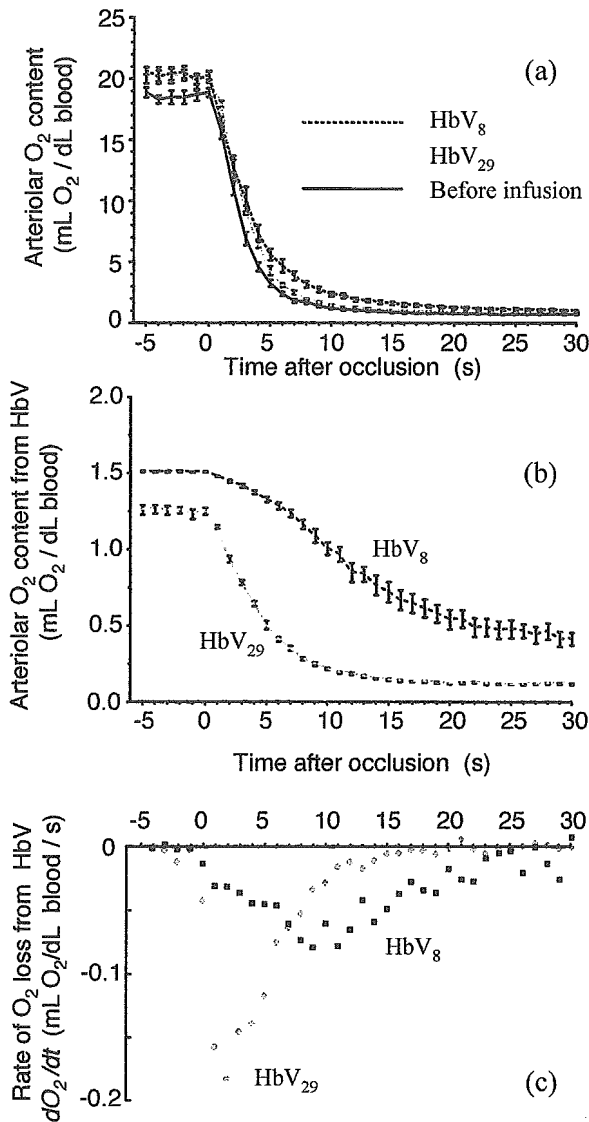


Fig. 9. (a) Time course of the arteriolar O₂ content in the whole blood of an occluded arteriole before and after infusion of 7 mL/kg HbV₈ or HbV₂₉ into hamsters. The O₂ contents are calculated using the equation (II) and the data of OECs and pO₂ changes. (b) Time course of the O₂ content derived from HbV in the blood. The contributions of HbV are derived from the data in Fig. 5(a) and magnified in scale. (c) Rate of O₂ loss from HbV. The graphs in (b) were differentiated and plotted.

血管内酸素分圧は 10 mmHg 以下になる。HbV₂₉ は血流停止後、直ぐに酸素を放出し、酸素飽和度は 10%以下に低下するのに対し、HbV₈ の酸素飽和度は 60%近い値を維持し、より多くの酸素を保持しながら酸素を徐放した(Fig. 9b)。投与量が全血液量の 10%と僅かであるにも拘らず、血中酸素含量の HbV₈ の寄与は、全体の 6 割に達し(Fig. 5)、低酸素領域では HbV が赤血球を上回る酸素供給源として

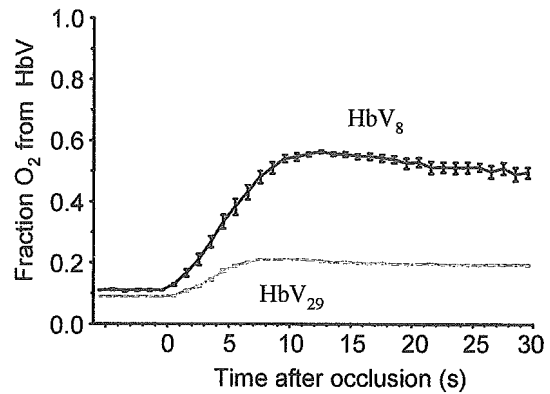


Fig. 10. Time course of the fraction of O₂ content from HbV in the whole blood. The extended time of occlusion induced hypoxic condition and the fraction of O₂ content from HbV₈ increased significantly in comparison with HbV₂₉.

作用していることが明らかとなった。

D. 結論

高酸素親和度(低 P₅₀)の HbV が、低酸素領域において主要な酸素供給源であることが明らかになった。Erni らの有茎皮弁における HbV による虚血領域の酸素化の向上は、血流が極めて緩やかな側副経路においても HbV が酸素を保持し、虚血領域に酸素を効率良く運搬したものと考えられる。

10. 極度な血液希釈における高酸素親和度 Hb 小胞体の効果

A. 研究目的

ヒト赤血球の酸素親和度は約 28 mmHg である。全身の酸素消費量は、動脈血酸素分圧(110 mmHg)と静脈血酸素分圧(40 mmHg)の間の酸素飽和度較差(A-V 較差, ヒト赤血球の場合は 25%程度)と Hb 濃度、それに心拍出量の積として算出される。

さて、赤血球から精製単離した Hb の P₅₀ は 8 mmHg 程度と低く、静脈血酸素分圧(40 mmHg)では到底酸素を放出しないので、Hb を利用する人工赤血球の P₅₀ も、赤血球と同等あるいはそれ以上に調