

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

ヘモグロビンアロステリーを利用した付加価値
赤血球製剤の創製と救急医療への応用

平成 15～17 年度 総合研究報告書

主任研究者 末松 誠

慶應義塾大学医学部 教授

平成 18 (2006) 年 3 月

年度別研究費

平成 15 年度	H15-医薬-011	¥22,000,000 -
平成 16 年度	H16-医薬-066	¥19,800,000 -
平成 17 年度	H17-医薬-069	¥16,000,000 -
総計		¥57,800,000 -

I 総合研究報告

主任研究者

末松 誠 慶應義塾大学医学部 教授

分担研究者

堀 進悟 慶應義塾大学医学部 助教授

酒井 宏水 早稲田大学理工総研 助教授

塚田 孝祐 慶應義塾大学医学部 助手

芹田 良平 慶應義塾大学医学部 助手

総合研究報告書： 目次

I 総合研究報告

ヘモグロビンアロステリーを利用した
付加価値赤血球製剤の創製と救急医療への応用 5

末松 誠

II 研究成果の刊行に関する一覧表 29

III 研究成果の刊行物・別刷 35

ヘモグロビンアロステリーを利用した 付加価値赤血球製剤の創製と救急医療への応用

主任研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部 医化学教室 教授

研究要旨：国民の篤志で得られた限られた量の血液をできる限り多くの患者に供給するためには、少量でも有効に酸素運搬をできる付加価値赤血球製剤の開発が不可欠であり、厚生労働行政上極めて重要な課題の解決が可能である。赤血球が酸素運搬や酸塩基平衡の調節に関与するだけでなく、積極的に微小循環血流維持作用を発揮している可能性が示唆されてきている。具体的には赤血球が血管内の酸素濃度を感知して NO などの低分子のガスや有機酸を活発に放出・回収を行い、その一部が血管拡張や血小板活性化制御に関与する可能性が示されつつある。Hb は一般に T-R transition と呼ばれる構造変化を酸素の乖離・結合に伴って示すことが知られているが、そのような可塑性は病態や赤血球がおかれた環境によって大きく変化する。本研究ではガス分子で Hb allostery を人為的に制御する手法を確立し、献血によって供与された赤血球が単に酸素運搬体として機能するだけでなく、出血性ショック等で輸血した際に末梢循環を改善する効果を有する付加価値赤血球製剤を創製する手法の確立を目的とした。平成 15 年度からの本プロジェクトの研究により T-state Hb を含有した赤血球は低酸素に伴う細胞外への ATP 放出が増強するため、ATP を介した血管拡張を通じて組織の酸素供給を増加させる作用を持つ可能性があることが明らかになった。このような T-state Hb の作用が虚血臓器における酸素代謝の改善をもたらすかどうかを肝臓微小循環の虚血モデルを用いて検証を試みた結果、 α -NO 赤血球はショックに対する酸素供給、血流改善が十分であることが明らかになった。最終的に霊長類への投与実験を行い、血圧や心拍の回復を確認した。以上の結果からガス分子による Hb アロステリーの人為的制御法を確立し、ショックに対する付加価値赤血球製剤としての有効性を示すに至った。

A. 研究目的

赤血球の酸素運搬以外の生体制御機能を分子論的に解明し、人為的にそのメカニズムを保存赤血球に修飾することにより、酸素放出能と血流改善効果を最大限に引き出す付加価値赤血球製剤の *in vivo* での性能評価、安全性確立に主眼を置く。特に膜透過性の高い低分子ガス

(NO, CO) による蛋白質機能修飾技術を利用した赤血球保存技術の向上と付加価値添加技術による篤志で得られた献血血液の有効利用を展開する。具体的には下記の 2 点に重点を置き研究を進める。

① α -NO-Hb, あるいは Hb を T-state で安定化させる低分子化合物を利用し、少ないヘモグロビン量でより多くの酸素を運搬できるような

赤血球製剤の実用的創製法を開発する。本年度は特に末梢循環における酸素デリバリーの定量化に重点的に取り組み、Hb allostery による血流改善効果を定量的に実証する。また Hb のメト化速度の定量的体内評価、赤血球膜の安定性などの評価を進める。

②CO-Hb 含有赤血球を利用した新しい保存法や徐放性酸素運搬体、細胞保護作用を発揮できる CO donor としての Hb 製剤をそれぞれ開発し、ショックモデルに対する輸血・蘇生実験への応用、また血液サンプルの体内寿命を定量化する。

国民の篤志で得られた限られた量の血液をできる限り多くの患者に供給する点を勘案すると、付加価値血液製剤を投与される個体のヘム解毒の負担を軽減できるメリットも見逃せない。正常個体と異なり、外科手術後やショック病態ではサイトカイン血症や低酸素ストレスによりヘム解毒酵素である heme oxygenase が誘導され、ヘムからビリルビンへの分解が異常に亢進することから、酸素輸送量あたりのヘムの絶対量を低下させることは、単に血液資源の節約という観点のみならず、それを投与される個体の高ビリルビン血症のリスクを軽減させることにつながるからである。また新規の α -NO-Hb の応用として、移植用グラフトの酸素化フラッシュ液として応用できる可能性がある。通常低温 (4°C) の状態では Hb heme と分子状酸素の affinity は増加するため、再灌流時の酸素輸送の向上には α -NO-Hb が適している。また再灌流時に生じる oxygen paradox を軽減するためには逆に CO-Hb の応用が可能であると考えている。さらにラジカル分子でない CO は mild vasorelaxant として応用が可能であり、組織に Hb よりも CO affinity が高いヘム蛋白が存在する筋肉や脳では Hb-CO による血管拡張効果が期待できる。以上のような可能性も本研究により実験的に評価することにより、残血赤血球の新たな需要の創出につながる可能性が

ある。

B. 研究方法

B-1 α -NO 赤血球の作製

本実験は慶應義塾大学動物実験委員会の承認を受け (No.1756)、実験指針に基づき実施された。健常ボランティアからヘパリン採血し、buffer にて3回洗浄後、ヘマトクリット 50% に調整した。対照に用いた洗浄赤血球はそれを用いることとし、CO 赤血球は Ar パージ処理により脱酸素化後、CO ガスをバブリングすることで作製した。 α -NO 赤血球に関しては同様に脱酸素化後、NO ドナーとして NOR3 (藤沢薬品工業より供与) を用いて作製した。NOR3 の添加量に関しては、作製した赤血球 suspension の Hb 量から分子量換算して Hb の α 鎖に特異的に NO ガスが結合するように調整した。

B-2 赤血球内代謝産物の網羅的解析

慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我朋義先生により開発されたキャピラリー電気泳動/質量分析装置 (CE-MS) による細胞内代謝産物の一斉解析 (メタボローム解析) 法を用いた。CO, NO などのガスリガンドが結合した赤血球サンプルを通常酸素環境下、および低酸素下において1分間 37°C に incubation し、赤血球内の代謝を促進させた。サンプルは速やかに 4°C に冷却し、buffer にて洗浄後、除タンパク処理して細胞内代謝産物を抽出し、メタボロームサンプルとした。

B-4 出血性ショックモデル実験 倫理面への配慮について

本研究はラットを対象とした急性実験であり、ペントバルビタール腹腔内麻酔を行ったうえで動物愛護に配慮して実験操作を行った。生体内での心機能評価において、動物は実験日まで十分な餌と水を与えて飼育した。また

実験に際しては、全例麻酔下に処置を行った。手術操作は可能な限り無菌的に行った。死亡率の検討において、ラットは十分な餌と水に加え、低濃度の pentobarbital 投与によるセデーション下に観察した。コモンマーモセットを用いた実験は(財)実験動物中央研究所動物資源開発部 霊長類共同実験施設にて行われ、事前に同施設において動物実験委員会の承認を得て行われた。また慶應義塾大学にて行われた実験に関しては慶應義塾大学動物実験委員会の承認を受け (No.1756), 実験指針に基づき実施された。

動物を用いた出血性ショックモデルの実験条件に関しては、動物の種類や実験の目的によってことなるので、結果の各項目において記載した。

C. 研究結果

C-1 赤血球サンプルの特性評価

図 1 に NO, CO をヘモグロビンに結合させた赤血球サンプルの図を示した。α-NO 赤血球はヘモグロビン α 鎖に NO が結合し、その立体構造を T-state に安定化され、deoxy 型の conformation であるので静脈血に近い色を呈している。また図 1 (右) はメタボローム解析に用いた α-NO 赤血球のサンプルを示した。遠心分離後のサンプル上清は無色透明を示しており、溶血もなく viability は保たれていることを示している。図 2 に Hb をガス分子で修飾した各サンプルの酸素解離曲線を示した。正常赤血球に対して CO 処理した赤血球はシグモイドカーブが左方シフトし、反対に α-NO 赤血球では右方シフトしており、それぞれ R-state, T-state に安定化されていることを確認した。酸素解離曲線から算出した p50 値は正常赤血球が $28.6 \pm 0.1\text{mmHg}$, CO 赤血球が $16.9 \pm 3.5\text{mmHg}$, α-NO 赤血球では $39.3 \pm 1.7\text{mmHg}$ であった。

C-2 メタボローム解析結果

本研究課題の初年度に遂行した正常赤血球の低酸素環境下における代謝のリモデリングを検討した結果、1 分、3 分の低酸素刺激に伴い解糖系の上流の代謝物の濃度が低下し、下流

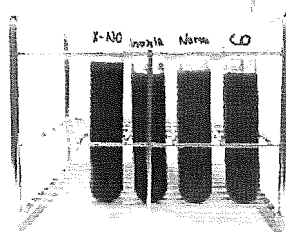


図 1 ガス分子修飾した赤血球 (左図:左から α-NO 赤血球, 低酸素下の赤血球, 通常酸素下の赤血球, CO 赤血球, 右図:遠心分離後の α-NO 赤血球)

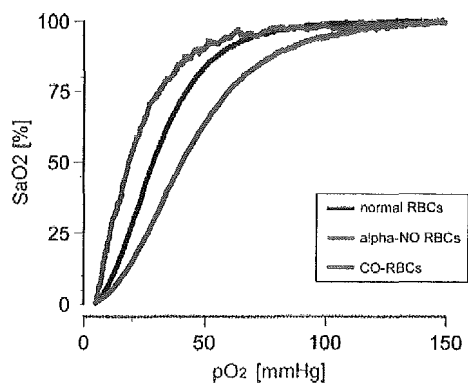


図 2 ガス分子修飾ヒト赤血球の酸素解離曲線

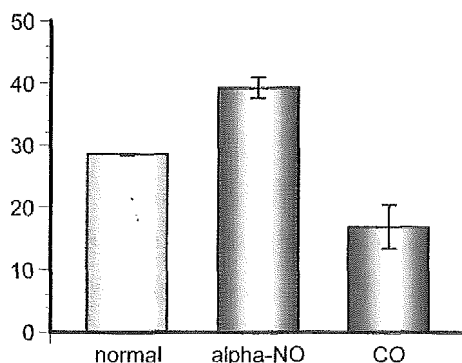


図 3 酸素解離曲線から算定した p50 値

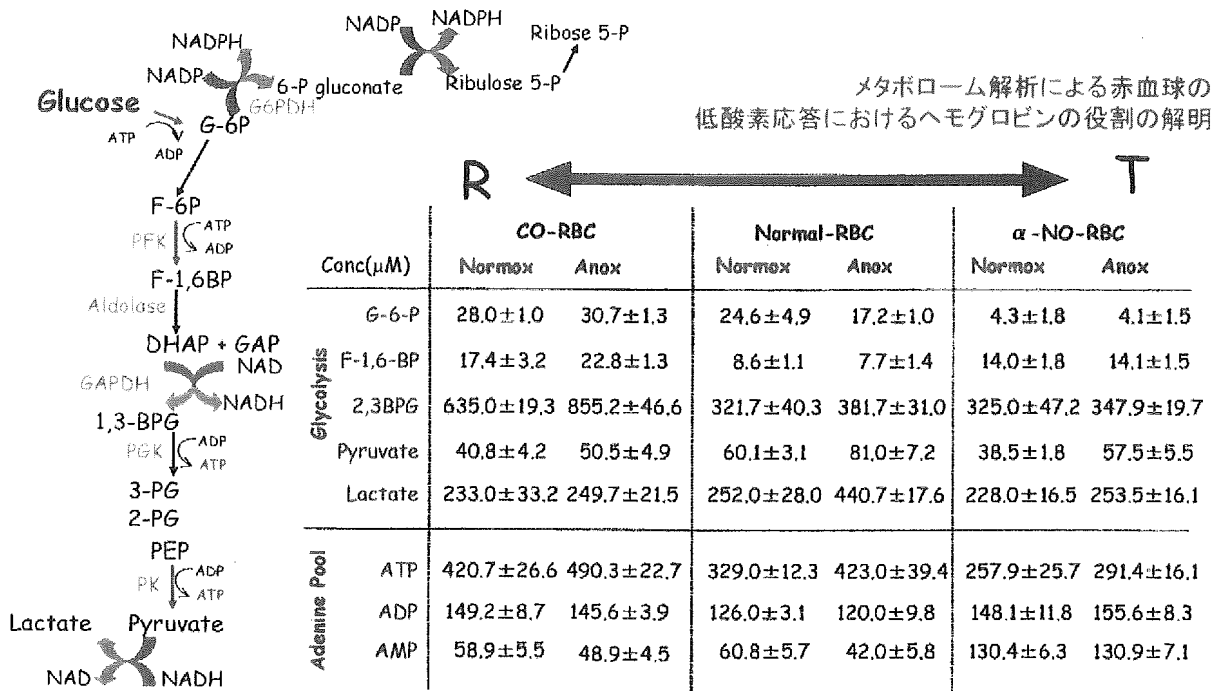


図4 ガス分子修飾ヘモグロビン含有赤血球における網羅的代謝解析結果

の代謝物の濃度が増加しており ATP の増加, adenosine の低下などが同時に起きていることを明らかにした. さらにこのメタボロームパターンの変化はあらかじめ赤血球を CO で処理し Hb を R-state に安定化させると消失することが明らかになったことから, 細胞内グルコース酸化速度が低酸素で加速する機構に Hb の構造変化が関与することが示唆された. また低酸素暴露で pentose monophosphate shunt (PMS) の生成物である ribose 5-P の低下, rate-limiting enzyme である G6P dehydrogenase の基質である NADP が使われずに上昇することも認められ, glucose 利用の大部分が解糖系に投入されている可能性が示唆された.

図4にα-NO赤血球を含めたメタボローム解析結果を示した. α-NO赤血球内部のATP量はCO赤血球, 正常赤血球に比べて低値を示したが, この現象は赤血球外部にATPが放出された結果とも考えられる. これはGlucose 6-phosphateの著しい減少が示すことから,

解糖系の加速によるATPの生成が促進されたと考えられる. 昨年度までの研究で赤血球が低酸素領域を通過する際に極めて早い反応としてATPを放出し, 微小循環領域の抵抗血管の拡張を起こす可能性が示唆されている. ウサギの脳細動脈の灌流標本を作製し, 一方向性に赤血球を流し血管径の変化を定量的に解析した結果, 低酸素性血管拡張は赤血球の存在に依存し, perfusateにATPの分解酵素(apirase)を添加すると消失し, あらかじめ赤血球をCO処理しておくで消失した. また血管内皮細胞のNOSを阻害すると拡張反応が消去できること, NOで処理したα-NO赤血球では低酸素にしないでも血管拡張が起こることを明らかにした. 更に, α-NO赤血球内部AMP量は軒並み増加しており, 解糖系律速酵素であるPFKはアロステリックに活性していると推測された.

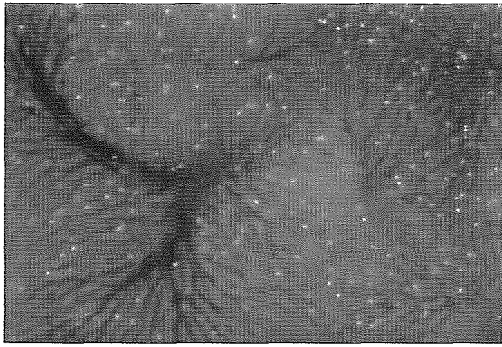


図5 ラット肝臓微小循環血流の可視化

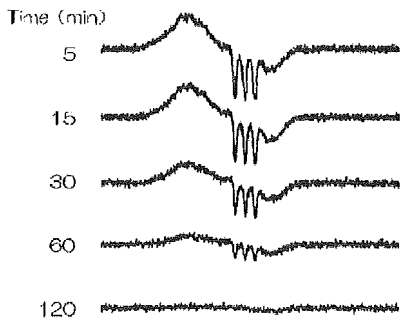


図6 ヒト由来 α -NO ヘモグロビンの ESR シグナル

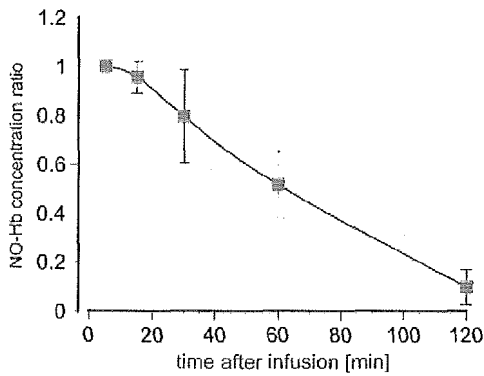


図7 ヒト α -NO 赤血球の体内代謝

C-3 出血性ショックモデル実験 酸素デリバリーの生体計測からの実証

Wistar ラット (約 300-320 g) を気管切開後調節呼吸とし, Isoflurane 麻酔下でラットの大腿動静脈にカニューレーションを行い, それぞれ 血圧測定および脱血・輸血に使用した. 腹部を正中切開し, さらに横切開を加え肝臓を露出し, アクリルステージに呼吸運動の肝臓への伝導

を抑制しながら展開した. 肝臓表面は温度を 37°C にコントロールしながら PBS を灌流した. 出血性ショックモデルは大腿動脈から 0.7 ml/min で脱血を行い, 血圧 40 mmHg を 15 分間維持し, その後保存ヒト赤血球を Hct 50% に調整し大腿静脈から 1.2 ml/min の速度で輸血した.

肝微小循環血流は赤血球を FITC で標識することで可視化した. また血流画像の解析にはパターンマッチングを応用した画像処理システムを利用した. FITC 蛍光標識赤血球を観察する一方で, 脳表微小血管内の酸素分圧は光励起されたポルフィリン分子から発光するリン光の酸素消光作用を利用することで計測を行った. 酸素プローブとして Pd-meso-tetra-(4-carboxyphenyl)- porphyrin (以下 Pd-TCPP) を用いた. 予め対象動物に Pd-TCPP を静脈内投与し, 落射光学顕微鏡の対物レンズを通して対象臓器の微小血管に励起光 (Q-switched Nd:YAG laser-SH, 波長 532 nm) を照射した. 血管内酸素濃度に依存して発光するリン光は 620 nm のロングパスフィルターを介して光電子増倍管を用いて光電変換した. 酸素分圧値への変換はリン光寿命を Stern-Volmer 式(1)に代入することで定量化した.

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot pO_2 \dots \dots \dots (1)$$

ここで I_0 と I は酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光強度, τ_0 とは同様に酸

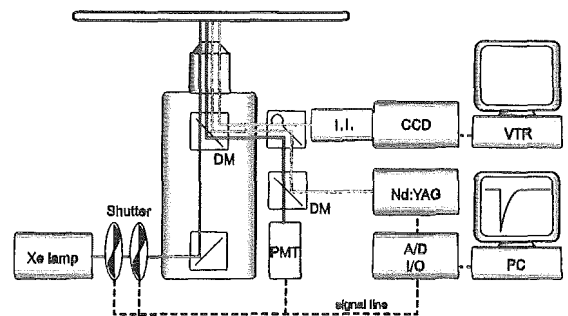


図8 局所血流・酸素分圧計測装置の概略

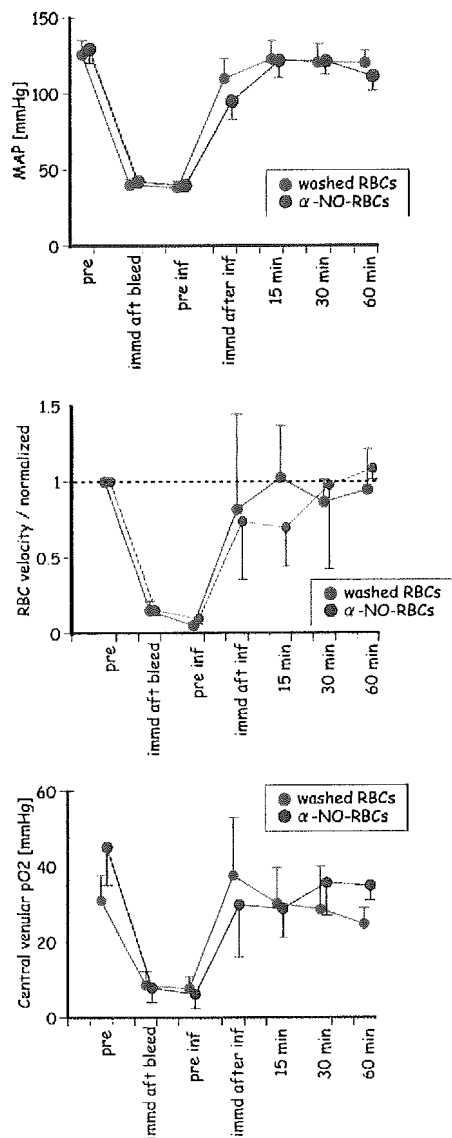


図 9 ラット出血性ショックモデルにおける正常 (赤), α -NO 赤血球 (青) 輸血時の (a) 血圧, (b) 血流速度, (c) 酸素分圧変化

酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光寿命, K_q は Stern-Volmer 定数である。

輸血された α -NO 赤血球が体内で代謝される速度を把握することは、その効果の持続時間を検討する上で極めて重要となる。 α -NO 赤血球を輸血後、5、15、30、60、120 分後にラット大腿動脈より微量採血し、速やかに液体窒素で 77K まで冷却後、電子スピン共鳴装置でヘモグロビン α 鎖に特異的に結合している NO の量

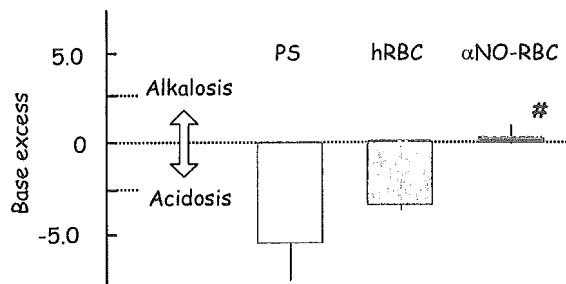


図 10 輸血1時間後の Base excess 値

を計測した。図 7 の結果より、 α -NO 赤血球の体内半減期は約 1 時間であることが分かった。これは救命医療に利用するには妥当な数値であると考えられる。

微小循環はエネルギーを得るための酸素やその他栄養物の運搬を行い、生命現象の恒常性維持に非常に重要な役割を担っている。40mmHg に達するまでの出血性ショックを惹起し、 α -NO 赤血球を輸血した際の肝臓微小循環へ与える影響を血流速度および酸素分圧計測から検討した。図 9 に急性出血性ショックおよび輸血時の血圧、中心静脈血流速度と酸素分圧変化の変化を示した。血圧の変化はコントロール群、 α -NO 赤血球群ではほぼ同様の変化を呈した。 α -NO 赤血球群で輸血時に血圧の快復がやや遅れる傾向が認められたが、これは血管拡張物質が輸液に含まれているか、或いは輸血直後に作用したものであると考えられた。また肝臓中心静脈血流速度は血圧とほぼ同様に低下し、輸血 30 分後にはベースラインまで回復した。同様にして酸素分圧は血圧の変化に対応して回復した。 α -NO 赤血球は正常赤血球と同等の酸素運搬能を有することが明らかになった。

図 10 に輸血 1 時間後の Base excess の値を示した。生理食塩水、正常赤血球投与群では代謝性アシドーシスを呈するのに対して、 α -NO 赤血球群ではそれが抑制される結果を得た。これは肝微小循環計測の結果からも明らかのように、血流の回復と肝細胞の機能維持に必要な十分な酸素が供給されていることを表しており、さ

らに洗浄赤血球よりもアシドーシスを改善する事実から勘案すると、組織における代謝を促進するような代謝産物が赤血球から組織に供給されている可能性を示唆する結果であると考えられる。

C-3 出血性ショックモデル実験 NO, CO ガスと Hb の Interaction

NO が血管内皮細胞から産生され、血管弛緩因子として作動することが報告されて以来、生体内 NO の情報伝達分子として様々な機能を果たすことが明らかにされている。また CO もヘム代謝の過程で微量に産生され、これが血管生理に極めて重要な役割を果たしていることが解ってきた。例えば肝臓では、肝実質細胞に存在する酵素：ヘムオキシゲナーゼ-2 (HO-2) がヘム分解酵素として存在し、ヘム 1 分子の分解に対して CO ガスを 1 分子放出する。これが肝類洞血管内皮の伊東細胞に対し、血管弛緩因子として作動することが明らかになっている (Goda et al., 1996)。内因性の CO ガスは更に、抗炎症作用を示すことも明らかになっている (Otterbein et al., 2000)。これらの事実から、CO の薬効を積極的に活用するため、静脈内投与可能な化合物としてルテニウムの CO 錯体を合成、CO 放出薬としての効果を見る研究も行われるようになってきた (Johnson et al., 2003)。また、一酸化炭素中毒で知られるように、不完全燃焼等で生じる CO ガスの吸入は極めて危険であるが、出血性ショック状態のラットに低濃度で吸入させることにより、多臓器不全の改善が見られることが明らかになっている (Zuckerbraun et al., 2005)。

赤血球に濃度高く含有する Hb は CO を結合し、その結合力は酸素の約 200 倍と強く、保存安定度が高いことも報告されている (US patent 5476764)。しかし、結合は可逆的で分圧に依存し、大気に曝せば次第に CO を放出し酸素錯体

になる。そこで本研究では、CO 結合-赤血球の投与効果を検討することを目的とし、出血性ショック状態のラットの投与試験を実施した。

Wistar 系ラットの赤血球を得るため、ラット (雄, 体重 250 - 300g) をエーテル麻酔下、開腹し、ヘパリン加シリンジを用い下大静脈より採血した。これを遠心分離 (2000g, 15 min) して赤血球層を得て、更に 5% アルブミン (HSA) 溶液を添加して遠心分離、再分散する操作を 2 回繰り返した。この洗浄赤血球分散液 10 mL を 50 mL 硝子容器に入れ、ブチルゴム製の蓋で封入した。金属製の導入針を刺し、CO ガスを通気し、Hb の配位子を全て CO に置換し、HbCO とした。自動血液ガス分析装置 (ABL700, Radiometer) では、COHb 含量は 90% 以上を示した。最終的に Hb 濃度を 8.6 g/dL に調節し、これを蘇生液 (RBC-HbCO) とした。また、CO 化処理を行わず酸素を結合したままの RBC-HbO₂ も同様に調製した。採血から投与試験に用いるまでの所要時間は、3 時間以内とした。

実験法は既報 (Sakai et al., 2004) に従った。Wistar rat (約 250g, ♂) に sevoflurane (1.5%) を吸入させ麻酔状態とし、自発呼吸を維持した。頸動脈、頸静脈にカテーテルを留置した。ラットの全血液量は 56 mL/kg と仮定し、28 mL/kg (約 8.4 mL/匹) を 1 mL/min の速度で頸動脈より脱血した。脱血後 15 分間放置してから試料を頸静脈から投与した。投与試料は、酸素を結合した洗浄赤血球 (RBC-HbO₂ 群, [Hb] = 8.6 g/dL)、CO を結合した洗浄赤血球 (RBC-HbCO 群, [Hb] = 8.6 g/dL) の 2 群である (n = 8)。投与後 6 時間まで血行動態、血液ガス組成、HbCO レベルの推移を観察した。測定ポイントは、脱血前、脱血後、投与直後、0.5, 1, 3, 6 時間後とした。計測終了後直ちに開腹し下大静脈から血液を 6 mL 程度採取、採血管に入れて遠心分離し血漿を得て、血液生化学的検査を実施した (BML 社依頼)。本研究では、肝機能を反映する項目として Alanine aminotransferase (ALT) および Aspartate

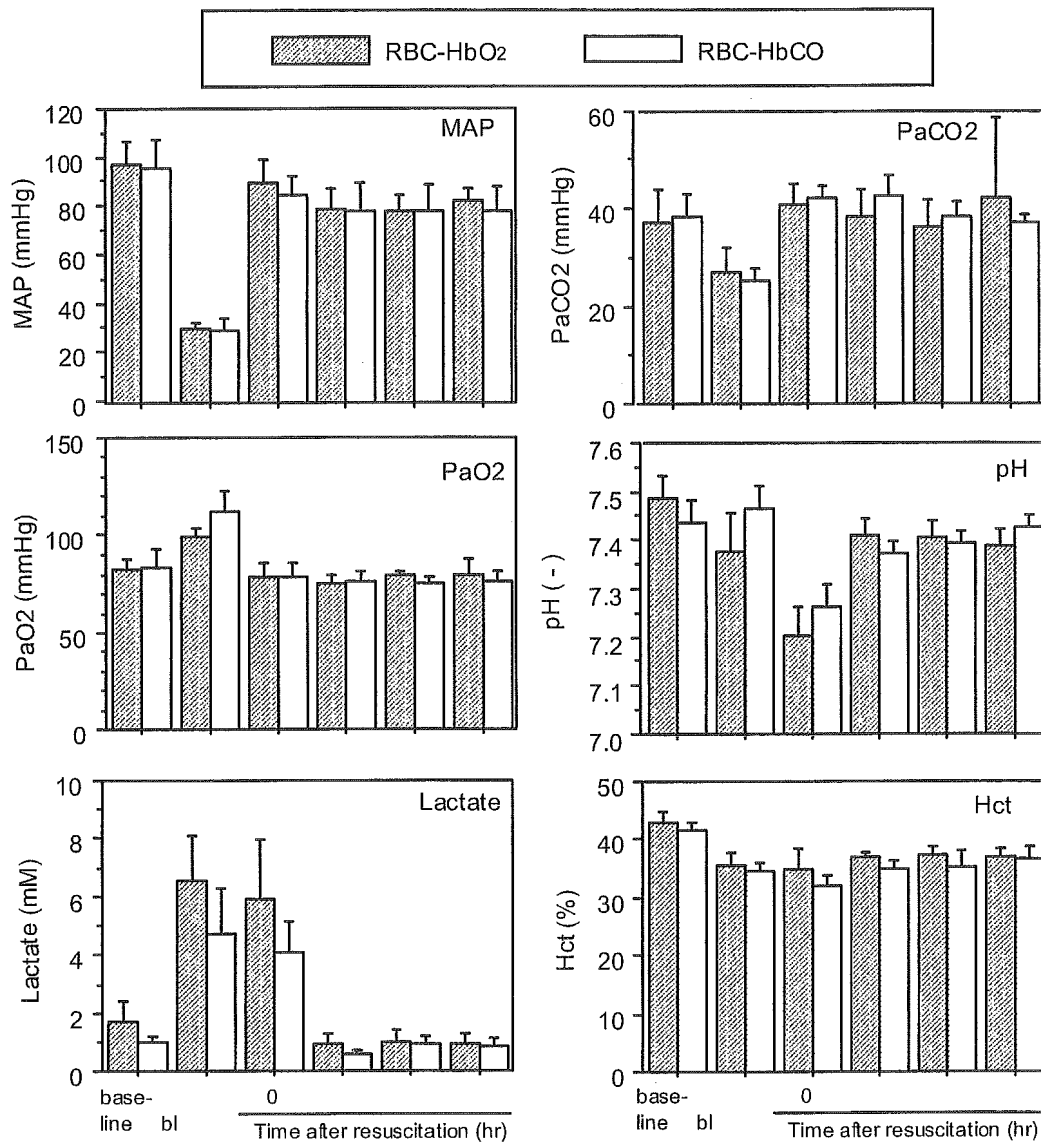


図 11 出血性ショック・蘇生実験(n = 8)における HbO₂ 赤血球および HbCO 赤血球投与前後の生理量変化.

aminotransferase (AST)について注目した.

図 11 に血圧, 血液ガス組成, ヘマトクリット(Hct)値の推移を示した. 両群ともに同等の推移を示した. 血圧は脱血前に 100mmHg 程度であったが, 脱血後に 30 mmHg 程度にまで低下した. 投与直後に 85-90mmHg にまで回復し, その後 6 時間 80mmHg 付近を推移した. Hct は, 脱血前約 43%であるが, 脱血後に約 35%に低下した. 蘇生液の Hb 濃度が 8.6 g/dL であり全血液の濃度よりも低い為, 蘇生直後の Hct に著変は無かった. 血液ガス組成については, 脱血後に代償機能により PaO₂ の上昇, PaCO₂

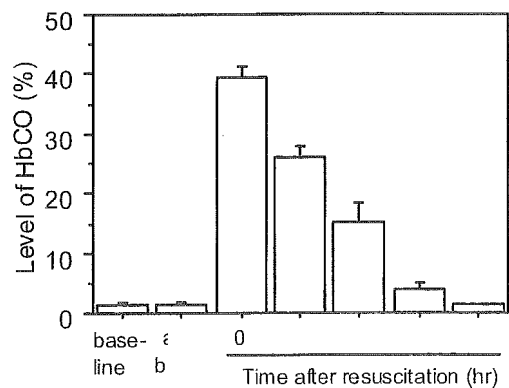


図 12 HbCO 赤血球群における HbCO レベル値(n = 8).

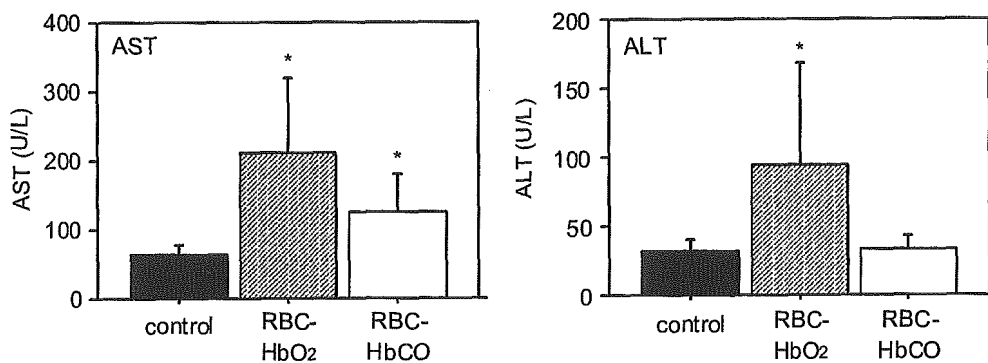


図 13 O₂ 赤血球, HbCO 赤血球(n = 8) 蘇生 6 時間後の AST および ALT 値
* p < 0.05 vs. control.

の低下, また pH の低下と乳酸値の上昇が見られた. 蘇生液の投与直後に, 両群に関して PaO₂, PaCO₂ が初期値にまで回復した. pH 値は投与直後に最低値を示した. また乳酸値も投与直後には回復しなかったが, 1 時間後には初期値まで回復し, 6 時間まで推移した. pH, 乳酸値の回復の遅れは, 投与直後に末梢微小循環が回復に向い, 蓄積していた代謝産物が wash out されたために見られた現象である.

図 12 に RBC-HbCO 群の血中 HbCO レベルの推移を示した. 投与前は 1.6 ± 0.3% であったが, 投与直後に 39.3 ± 2.0% を示した. その後, 経時的に低下し, 1 時間後には 15.3 ± 3.0%, 6 時間後には 1.3 ± 0.3% で投与前のレベルにまで低下し, ほぼ完全に CO が放出していた.

6 時間経過後の AST 値, ALT 値の結果を図 13 に示す. RBC-HbO₂ 群, RBC-HbCO 群の AST 値はそれぞれ 211 ± 109 U/L, 126 ± 54 U/L であり, control 群の 64 ± 13 U/L よりも高い値となったが, RBC-HbCO 群の方が低い値を示した. また, ALT 値は RBC-HbO₂ 群, RBC-HbCO 群それぞれ, 95 ± 73 U/L, 33 ± 9 U/L となり, RBC-HbO₂ 群は control 値 32 ± 8 U/L に比較して極めて高い値になっていたが, RBC-HbCO 群ではほぼ同等の値にまで低下していた.

C-3 出血性ショックモデル実験

CO₂ によるアロステリー制御と輸血効果

出血性ショック・再灌流後に見られる多臓器障害は, サイトカイン, 一酸化窒素 (NO), Oxygen free radical 等が関与し, さらにミトコンドリアの傷害や酸素需給バランスの障害により引き起こされる (Shock 1999 12(1):1, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000 278(3):H942). また, 臓器不全の一つである心機能の低下は, 更なる酸素需給バランスの障害を引き起こし, 悪化させる可能性がある (Lancet 2004 12;363(9425):1988).

一方, 高濃度の CO₂ の暴露によりアロステリー変化を受けたヘモグロビン血 (CO₂-hemoglobin 血) は構造的変化から酸素放出能の増加により組織の酸素摂取率を増加させ, 酸素需給バランスを改善するだけでなく, ATP 放出によるレオロジー変化により末梢循環をも改善し, 出血性ショック・再灌流後の心拍出量維持に効果的である可能性がある.

そこで, CO₂-hemoglobin 血の投与が, 出血性ショック・再灌流後の心機能障害に与える影響をラット出血性ショック・再灌流モデルで検討した.

ドナーラットの上行大動脈にカニューレシオンを行い, 血液を採取した. その後, 洗浄赤血球を作成した. 人工肺 (ラット人工肺 泉工

医科 東京) を用いて, 4 倍希釈したラット洗浄赤血球を 60 分間 100%CO₂ により脱酸素化, CO₂-hemoglobin 血 (CO₂-Hb 血) を作成した.

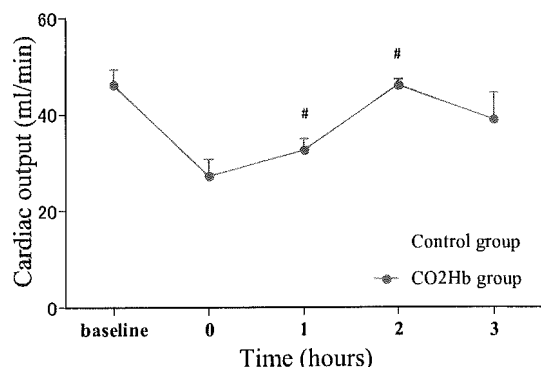


図 14 ラット出血性ショックモデルにおける心拍出量の経時変化
横軸の 0 は, 輸血直前の値. #: p < 0.05 vs. Control at the time point

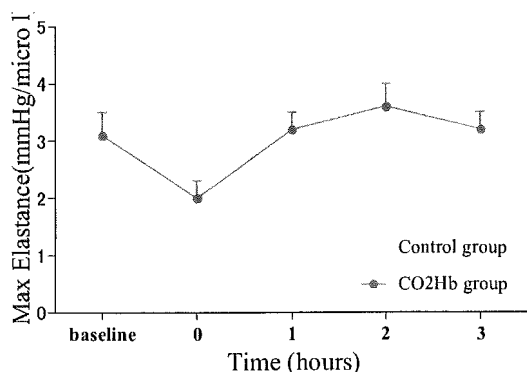


図 15 ラット出血性ショックモデルにおける Max Elastance の経時変化
横軸の 0 は, 輸血直前の値

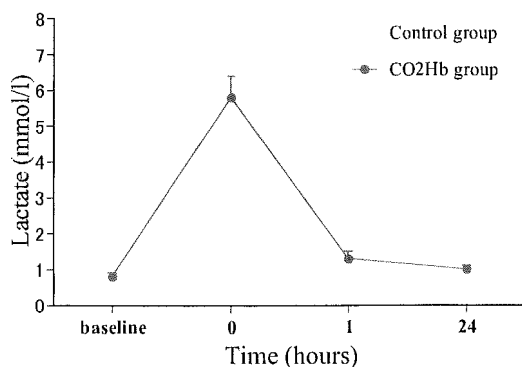


図 16 ラット出血性ショックモデルにおける乳酸値の経時変化
横軸の 0 は, 輸血直前の値

その後, CO₂-Hb 血は, CO₂ により脱酸素化した生理食塩水で再び洗浄し, ヘマトクリット 30%の洗浄血とした.

ラット 12 匹(Wister 系ラット雄 360~380 g) を, pentobarbital 麻酔下に内頸動静脈にカニューレーションし, 静脈カテーテルより生理的食塩水を 10ml/kg/hr で投与を開始した. 続いて, 気管切開し, 人工呼吸管理を行った. 内頸動脈カテーテルより, 圧センサー付コンダクタンスカテーテル (SPR-838 MILLAR USA) を挿入した. 圧センサー付コンダクタンスカテーテルは, 容積信号ケーブル (CEC-10 MILLAR USA) を通して, 心室圧-容積測定装置 (ARIA-1 MILLAR USA) に接続し, コンピューターを用いて解析した. その後, 体重 100g 当たり 3.1 ml の脱血 (Shock 2004 22(2):151) を行い, 重度出血性ショックモデルを作成した. 1 時間後, 無作為に 2 群に分け, 脱血相当量の CO₂-hemoglobin 血 (CO₂-Hb group) または洗浄赤血球血 (Control group) を内頸静脈カテーテルから 10 分間かけて投与した. その後, 心機能の測定は, 1 時間ごとに 3 時間まで行った.

ラット 20 匹(Wister 系ラット雄 360~380 g) を, pentobarbital 麻酔下に内頸動静脈にカニューレーションし, 静脈カテーテルより生理的食塩水を 10ml/kg/hr で投与を開始した. その後, 体重 100g 当たり 3.1 ml の脱血 (Shock 2004 22(2):151) を行い, 重度出血性ショックモデルを作成した. 1 時間後, 無作為に 2 群に分け, 脱血相当量の CO₂-hemoglobin 血 (CO₂-Hb group) または洗浄赤血球血 (Control group) を内頸静脈カテーテルから投与した. 輸血後 24 時間観察し, 死亡率を観察した. また, 脱血前, 脱血 1 時間後, 24 時間後に採血し, 血液ガス分析装置 (ABL 700 RADIOMETER COPENHAGEN) で血中の乳酸値を測定した.

心拍出量の経時的な変化を図 14 に示す. 再灌流後の心拍出量は, Control group に比し CO₂-Hb group で有意に高い値を示した (p <

0.01).

24 時間後の死亡率は、両群とも 0% で差はなかった。また、脱血前、脱血 1 時間後、24 時間後の乳酸値は、有意な差を認めなかった ($p = 0.9$) (図 16)。

B-3 出血性ショックモデル実験

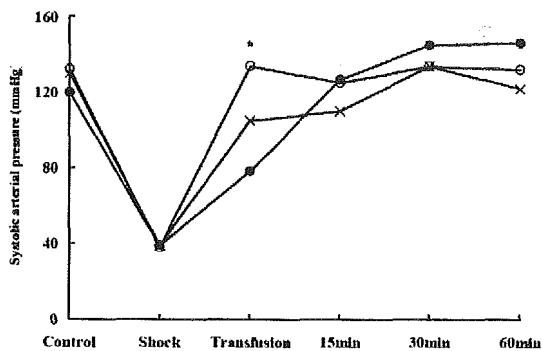


図 17 収縮期血圧の経過

Closed circle は α -NO 赤血球, cross は CO 赤血球, そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control, 収縮期血圧 $< 45\text{mmHg}$ の維持開始 15 分後を shock, 輸血直後を transfusion とし, 輸血 15 分後, 30 分後, 60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P < 0.001$, *: ANOVA: $P < 0.001$.

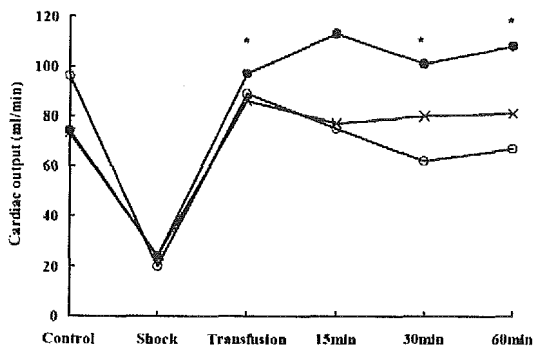


図 18 心拍出量の経過

Closed circle は α -NO 赤血球, cross は CO 赤血球, そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control, 収縮期血圧 $< 45\text{mmHg}$ の維持開始 15 分後を shock, 輸血直後を transfusion とし, 輸血 15 分後, 30 分後, 60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P < 0.001$, *: $P < 0.01$.

救命領域からのアプローチ

ラット出血性ショックモデルにおいて、 α -NO 赤血球の輸血が血行動態と代謝指標に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、一酸化酸素 Hb (CO-Hb) を含む CO 赤血球と、これらの処理を行なわなかった洗浄赤血球との比較を行なった。なお、CO-Hb は T-state に安定化した α -NO Hb と異なり、CO によってヘム

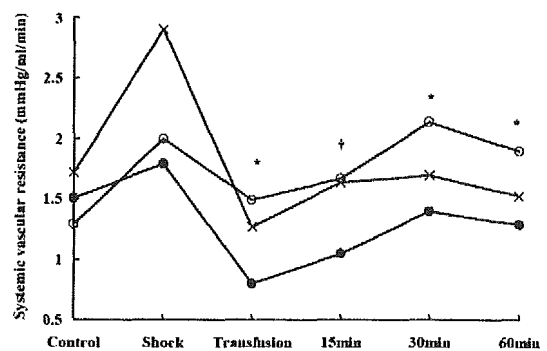


図 19 全身血管抵抗の経過

Closed circle は α -NO 赤血球, cross は CO 赤血球, そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control, 収縮期血圧 $< 45\text{mmHg}$ の維持開始 15 分後を shock, 輸血直後を transfusion とし, 輸血 15 分後, 30 分後, 60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P < 0.001$, *: $P < 0.01$, †: $P < 0.05$.

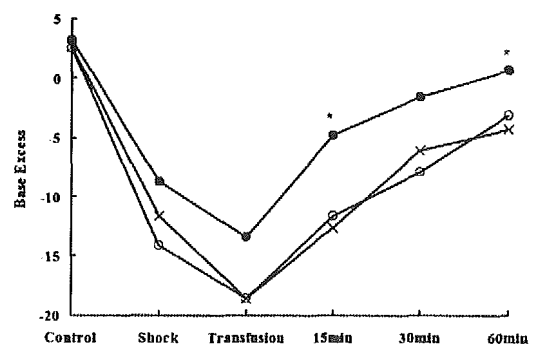


図 20 Base Excess の経過

Closed circle は α -NO 赤血球, cross は CO 赤血球, そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control, 収縮期血圧 $< 45\text{mmHg}$ の維持開始 15 分後を shock, 輸血直後を transfusion とし, 輸血 15 分後, 30 分後, 60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P = 0.02$, *: $P < 0.05$.

の構造が R-state に安定化されていることに着目し、比較を行なった。

従来の非細胞型人工ヘモグロビンの評価研究では、対照を細胞外液によるクリスタロイド輸液あるいは蛋白添加により膠質浸透圧を上昇させた輸液を用い、その効果を比較してきた。しかし、付加価値赤血球の検討では、対照は native の赤血球でなければならぬ。本研究では洗浄赤血球の大量輸血と付加価値赤血球の大量輸血との比較を行なう実験系を用いた。

ヒト洗浄赤血球を modified SAGM 溶液で希釈した後、アルゴンガスをパージして脱酸素化し、①ヘモグロビンの 1/2 モル相当の NO donor (NOR-3) を投与して、生食で洗浄後にヘマトクリットを 50% に調整して 37°C に保温した α -NO 赤血球液、②NO donor を投与せず、生食で洗浄後にヘマトクリットを 50% に調整して 37°C に保温した洗浄赤血球液、③CO ガスでパージして CO-Hb 化し、生食で洗浄後にヘマトクリットを 50% に調整して 37°C に保温した CO 赤血球液を作成した。第 7 週齢の Wistar 系雄性ラット (30 匹, 210 \pm 3 g) にペントバルビタール腹腔内麻酔 (50mg/kg) を行い、左大腿動脈に脱血用カテーテルを挿入し同時に動脈血圧測定を行った。左総頸動脈には温度センサーを留置し、右内頸静脈には生理的食塩水投与用のカテーテルを留置して、熱希釈法による心拍出量測定を行なった。これらのデータは連続的にパーソナルコンピュータに記録し解析を行なった (PowerLab, AD Instruments Japan Inc., Nagoya, Japan)。体温はヒートランプで 37°C 以上に維持した。脱血用カテーテルから 1.0ml/min の速度で脱血を行い、収縮期血圧 (SAP) <45mmHg を 15 分間維持した。その後、脱血量と同量の α -NO 赤血球液、洗浄赤血球液または CO 赤血球液を 1.0ml/min の速度で輸血した。脱血前、ショック維持 15 分後、輸血直後、15 分後、30 分後、および 60 分後に血行動態測定と動脈血採取 (pH, PaCO₂, HCO₃-,

Base Excess を測定, iSTAT[i-STAT Co., Ltd., USA]) を行なった。

本研究における検討対象のラット 30 匹の体重と総脱血量に有意差を認めなかった。

収縮期血圧の経過は図 17 に示すように、3 群間で差が認められ (repeated ANOVA: P<0.001), α -NO 赤血球の輸血直後は洗浄赤血球や CO 赤血球の輸血群と比較して収縮期血圧が低値であった (ANOVA: P<0.001)。心拍出量と全身血管抵抗の経過は、3 群間で異なることが示された (図 18, 19, repeated ANOVA: P<0.001)。輸血直後、輸血 30 分後、および 60 分後では、 α -NO 赤血球輸血群が洗浄赤血球輸血群と比較して有意に心拍出量が大きく (ANOVA: P<0.01), 全身血管抵抗も、 α -NO 赤血球輸血群が洗浄赤血球輸血群と比較して有意に低いことが示された (ANOVA: P<0.05)。

動脈血ガス分析では pH の経過に有意差を認めなかった (repeated ANOVA: P=0.22)。PaCO₂ では、3 群の経過に有意差を認めないものの (repeated ANOVA: P=0.11), 輸血 15 分後以降は α -NO 赤血球輸血群が高値であることが示された (ANOVA: P<0.05)。また、動脈血の HCO₃-の経過には 3 群間で有意差が認められ (repeated ANOVA: P=0.04), 輸血 15 分後以降は α -NO 赤血球輸血群が高値であった (ANOVA: P<0.05)。Base Excess の経過においても、3 群間には有意差を認め (repeated ANOVA: P=0.04), 輸血 15 分後と 60 分後では α -NO 赤血球輸血群が高値であった (ANOVA: P<0.05, 図 20)。

B-3 出血性ショックモデル実験 霊長類への投与実験

実験に用いたコモンマーマーモセットに導入麻酔薬として硫酸アトロピン、ミダゾラム (筋肉内投与) および非動化薬として塩酸ケタミン (筋肉内投与) を用いた。気管内挿管を施し、

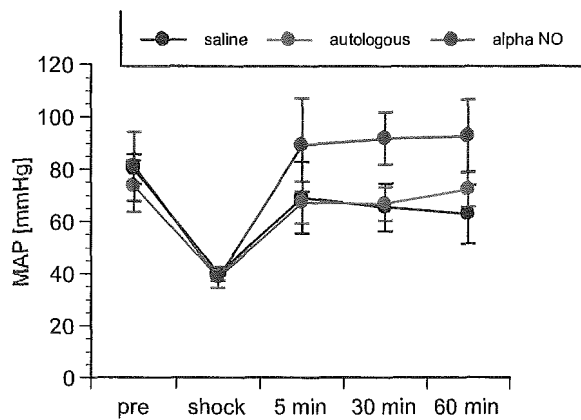


図 21 コモンマーモセットにおける出血性ショックモデルでの各輸液投与前後の血圧変化

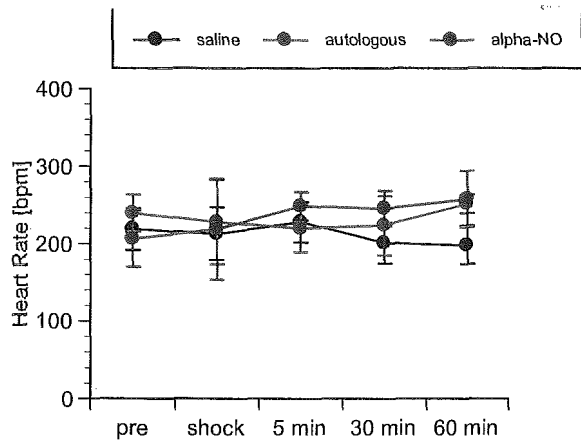


図 22 コモンマーモセットにおける出血性ショックモデルでの各輸液投与前後の心拍数変化

Isoflurane (1.2~1.4%) で生理状態を維持した。酸素ガスをレスピレータに接続し、ストローク数 26/min, 一回換気量 6 ml に設定した。術中は適切な麻酔薬, 方法を選択し, 最適な麻酔環境下で処置を行った。術後は速やかに体調等を回復させるよう感染防止および疼痛管理を実施し (処置部位の消毒, 抗生剤, 鎮痛・消炎解熱剤の投与), 栄養状態にも留意した。安楽死の方法は塩酸ケタミン麻酔下での放血安楽死とした。

コモンマーモセットを無作為に 3 群に分け, それぞれ α -NO 赤血球 (n=3), 洗浄自己赤血球 (n=3), 生理食塩水群 (n=3) とした。右大

腿部に A ライン (脱血用) および V ライン (輸血用) を確保し, また左大腿部に A ライン (血圧測定用) を確保した。30 分間の血圧安定を確認し, 0.5ml/min で脱血を開始した。血圧が 40mmHg に達するか, 或いは脱血量が全血液量 40% に達した時点で脱血を停止し, 30 分間維持した。 α -NO 赤血球, 洗浄自己赤血球, 生理食塩水を 1.0ml/min で脱血量と同量輸液し, 完了後 1 時間血圧を観察した。実験終了後, 採血を行い血液ガスを分析した。実験後のコモンマーモセットは縫合処置を行い, 蘇生後経過観察とした。

今回用いたコモンマーモセットの体重は生理食塩水群が $295 \pm 7g$, 自己血液群は $283 \pm 32g$, α -NO 赤血球群では $310 \pm 9g$ であった。また, ショック状態に至る脱血量はコモンマーモセットの体重より推定し, 全循環血液量に対して生理食塩水群: $36.0 \pm 4.8\%$, 洗浄自己赤血球群: $35.7 \pm 1.2\%$, α -NO 赤血球群: $27.5 \pm 5.0\%$ であった。

図 21 に生理食塩水群, 自己血液群, α -NO 赤血球投与群の輸血前後の血圧の変化を示した。Isoflurane による吸入麻酔を開始してから 30 分後に血圧の安定を確認し, ショック前血圧値(pre)とした。また脱血直後の血圧をショック時における値とし, 輸血 5 分後, 30 分後, 60 分後の血圧を記録した。

脱血前およびショック時の血圧は各群ともに同様の変化を示しており, すなわち各群の間で同様の麻酔深度, 生理状態が維持されていると言える。輸血後の血圧変化は生理食塩水群, 自己血液群は同様の変化を示した。一方, α -NO 赤血球輸血群は他の群に比べて血圧の回復が良好であった。これは脱血量が他の群に比べて少なかったことも一因と考えられるが, 前述のようにショック時の血圧は全ての群において 40mmHg まで低下しており, α -NO 赤血球の輸血効果によるものと考えていい。前年度までのラットを用いた実験においても, 血圧の

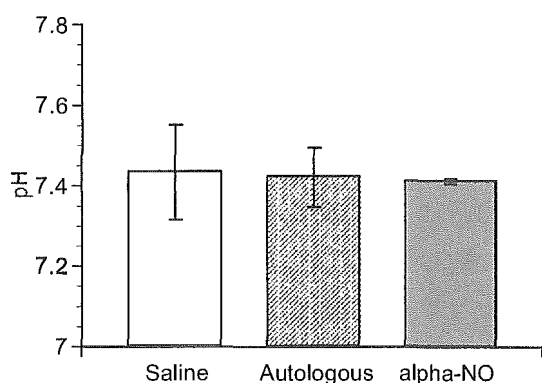


図 23 コモンマーモセット出血性ショックモデル
蘇生1時間後の血漿 pH 値

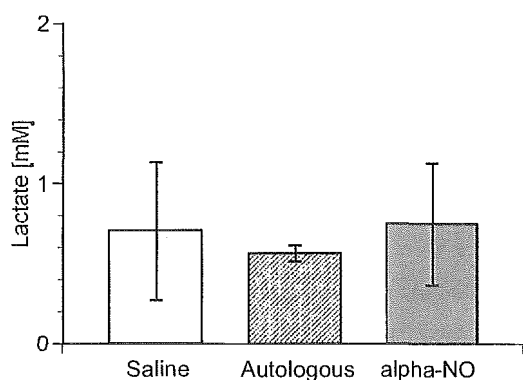


図 24 コモンマーモセット出血性ショックモデル
蘇生1時間後の血漿 Lactate 値

回復は生理食塩水や自己血液と同等の回復を示すことが分かっており、霊長類においても良好な血圧の回復を呈することが示された。また、齧歯類の実験では輸血直後に血圧の一時的な低下が認められたが、マーモセットではその現象は認められなかった。これは α -NO赤血球の作製法の違いによるものと懸念されたが、今回の作製法でもヘモグロビン α 鎖に特異的にNOが結合されていることは電子スピン共鳴法より確認済みであり、動物種による違いと思われた。一方、図22に示したように実験中の心拍数は各群において著明な変化は認められなかった。

各輸液を輸血して1時間後に採血を行い、血漿 pH、Lactate 値を分析した。図23に示したように、輸血後 pH は生理食塩水群では $7.43 \pm$

0.12 、自己血液群では 7.42 ± 0.07 、 α -NO 赤血球では 7.41 ± 0.01 であり、全ての群において正常値を示した。また図24に示したように、血漿 Lactate 値は生理食塩水群が 0.70 ± 0.43 mM、自己血液群が 0.57 ± 0.05 mM、 α -NO 赤血球では 0.75 ± 0.38 mM であり、自己血液群と同等のショックからの回復を示すものであった。

D. 考察

D-1 輸血マテリアルとしての α -NO赤血球

本研究では作製した α -NO赤血球の有効性を評価する手段として細胞内代謝産物を網羅的に解析可能なメタボローム解析法を用いた。平成15年度の結果より極めて重要な実験知見が得られた。その最も重要なものは血液体積の50%を占める赤血球が単なる酸素運搬体として働くばかりでなく、微小循環局所の酸素分圧変化や shear stress を感知して血管拡張物質を放出したり、血管収縮物質を吸収したりする metabolic sink として作用していることが明らかにされたことである。Hb は酸素の脱着により、膜蛋白である Band III への affinity を変化させることが明らかにされている。興味深いことに Band III の細胞内ドメインの Hb の結合部位近傍には、複数の解糖系酵素： PFK, Aldolase, GAPDH の結合部位が存在しており、酸素濃度の低下により Hb が結合することにより、これらの酵素が乖離して活性化される可能性がある。また Band III には carbonic anhydrase II の結合部位が知られており、この酵素は結合型の活性が増加するとの報告がなされている。Hb の T-R transition によってこれらの酵素群が Band III の周辺で metabolon を形成して酸素運搬と pH 調節を効率よく促進する可能性があるが、今後の課題とした。

また輸血された α -NO赤血球の体内代謝を検討するために、輸血後経時的に血液をサンブ

リングし、電子スピン共鳴法を用いて定量した。 α -NO 赤血球の体内半減期は約 1 時間程度であり、この減少は α -NO 赤血球自体が脾臓等で破壊され代謝される場合や、NO がヘムから解離して正常な赤血球として機能する場合が考えられる。特に外傷性出血性ショックを想定する場合には 1 時間の半減期は必要十分であり、血圧回復後には速やかに代謝することを考えれば妥当な体内代謝動態を呈すると言える。以上の結果を踏まえ、以下の出血性ショックモデルを作製して検討した。

D-2 出血性ショックモデルによる検討

血圧を 40mmHg まで脱血する出血性ショックモデルを惹起して α -NO 赤血球を輸血した際の循環動態を肝臓を中心に検討した。 α -NO 赤血球の血圧、心拍数への影響は実験結果から少ないことが明らかになった。 α -NO 赤血球を輸血後、一時的に血圧が低下する例が見受けられたが、これは α -NO 赤血球、或いは溶媒から NO が全身的に作用し、血管拡張が生じた結果であると思われた。肝臓微小循環を中心に検討した結果、輸血後の血流速度は対照に用いた洗浄と同等の血流の回復が観察された。一方、酸素デリバリーを検討すべく中心静脈の酸素分圧を計測した結果、洗浄赤血球に比べて酸素分圧の回復は時間変化として低いものであった。これは一見 α -NO 赤血球の酸素輸送能が低下していると考えられるが、BE の回復や胆汁流量の増大など、肝細胞におけるエネルギー代謝は必要十分である結果を得ており、即ち血流によって運搬された酸素は十分であり、細胞における酸素消費量が増大したと考えられる。

また図 10 からも出血性ショックに対する α -NO 赤血球輸血が代謝性アシドーシスを早期に改善しうることが示された。この機序として、 α -NO 赤血球が血管拡張作用を有し、心拍出量と組織血流が確保されること、および T-state

の Hb が低酸素下において酸素分子を放出しやすい特徴を有することが組織への酸素供給を高めていると考えられた。一方、CO 赤血球では弱い血管拡張作用を有することが示唆されたが、R-state で安定化しており、酸素分子の組織への放出が限られるため、出血性ショックの蘇生に対しては代謝性アシドーシスの改善が遅延すると考えられた。出血性ショックにおける組織の酸素負債は急性代謝性アシドーシスの指標である HCO_3^- と BE によって示される。本研究では、出血性ショックによって誘導された代謝性アシドーシスの改善が CO 赤血球や洗浄赤血球の輸血より α -NO 赤血球の輸血で優れていることが示された。 α -NO 赤血球の DO_2 は 3 群のうちで最も高いことが代謝性アシドーシスに対する改善効果を発揮していると考えられた。

一方、CO を結合した赤血球を投与したところ、HbCO のレベルは投与直後 39% であったが、6 時間以内にほぼ完全に放出されることが明らかになった。一般に CO ガス中毒とは、CO ガスに長時間曝された場合に生体内に CO が蓄積されていく過程で生じ、生命が危険な状態に至る。例えば、気中 CO 濃度が僅か 0.05% でも 4 時間曝されると血中 HbCO は 40% に到達し、昏睡状態に陥る。本動物実験の場合、ラットは CO を含まない空気を吸入しているので、投与された血中 CO は体内で薬理効果を示した後、最終定期には肺を経由して呼気として体外に速やかに排出される。HbCO 錯体の安定度定数は HbO₂ の約 200 倍であるが配位子の結合は濃度に依存した平衡反応であり、血中では O₂ 濃度が圧倒的に高いため、HbCO は次第に HbO₂ に変換されたものと考えられる。図 11 に示すように、投与後 6 時間までの間、両群に血行動態、血液ガス組成には顕著な差は無く、CO ガスの毒性を表す変化は確認されなかった。

出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流を意味し、活性酸素の産生による様々な

障害, いわゆる虚血再灌流障害, 更には多臓器不全に繋がる可能性がある. 一般的に虚血状態では細胞内 ATP が代謝されてヒポキサンチンになり, これが組織内に高濃度で蓄積する. ここに再灌流により酸素が供給されるとキサンチンオキシダーゼの作用により活性酸素(スーパーオキシド)が多量に発生する. また, マクロファージが活性化されて炎症性サイトカインを産生し, これに反応して好中球などが遊走される. 各種接着因子も誘導され, 好中球は血管内皮細胞に接着し, 更に血管外組織にまで浸潤する. ここに再灌流により酸素が供給されると, 好中球細胞膜にある NADPH-オキシダーゼが大量の活性酸素を産生する. 従って, 出血性ショックに対する蘇生として輸血することは, 初期の状態においては生体に対し酸素を過剰に供給して活性酸素産生を促し, 虚血再灌流障害を助長させる可能性がある. 従って, CO が結合した RBC-HbCO を投与することは, 酸素運搬機能が初期は抑制され循環血液量の回復と血液粘弾性の維持にのみ寄与し, 次第に酸素運搬機能が增大するので, 理想的な蘇生液なのかも知れない.

また CO の放出により, 血管拡張効果が期待出来る. その機序としては, ①CO が血管壁平滑筋にあるグアニル酸シクラーゼ(GC)に直接結合して血管拡張し, 末梢血流を改善する, また, ②正常組織では血管弛緩因子である NO がミオグロビン(Mb)と反応して失活する経路が存在するが, このとき投与 CO が Mb に結合することにより, NO の失活が抑制される. GC に対する作用は CO よりも NO の方が数千倍強力であり, 血管拡張により末梢血流を改善する. そして, ③末梢血流の改善は, 代謝産物の除去と酸素供給を促進することになる.

一般的に AST は, 心筋, 肝, 脳に高濃度に存在し, ついで骨格筋, 腎などに多く含まれる. また, ALT は肝臓に最も多く含まれ, 以下は腎, 心筋, 骨格筋の順番である. 臨床的には,

AST, ALT の上昇は主に肝疾患の時に見られる. 従って, AST 値および ALT 値が著明に増大した事実から, 出血性ショックによる虚血と酸素を結合した RBC-HbO₂ の投与による再灌流の結果, 肝臓に虚血再灌流障害が生じた可能性がある. 一方で CO を結合した RBC-HbCO の投与ではこれが低減されたと考えられた.

D-3 霊長類への投与実験

これまでの齧歯類の輸血実験に加え, 小型霊長類でその輸血効果を実証することはヒトに適応する製剤の効果と安全性の検討に必要不可欠である. カニクイザルを用いた個体差の大きいデータ解析の問題点と血液製剤の量的節約を実現する上で, コモンマーモセットを用いた. 出血性ショックに対して α -NO 赤血球を輸血した結果, ショック前の血圧まで十分回復することが明らかになった. また対照として用いた洗浄自己赤血球群より増大する傾向が認められた. これまでの齧歯類による実験結果においても α -NO 赤血球による輸血は良好な血圧の回復を示したが, 霊長類においてもそれが確認された. また輸血後の血液分析から, 血漿 pH, 乳酸値は正常範囲まで回復することが明らかになった. これは α -NO 赤血球が組織における酸素の需要に対して十分供給されていることを示す結果である. これまでの齧歯類の実験から, α -NO 赤血球は代謝性アシドーシスを改善する効果を有することを示したが, 今回のコモンマーモセットの実験からはその優位性を示すには至らなかった. これは動物種によるショックに対する抵抗性の違いによるものと思われた.

D. 結論

ヘモグロビン α 鎖に特異的に NO ガス分子を修飾して得られる赤血球機能を救急医療用途に適したマテリアルとする可能性について, 生体内における機能を *in vitro* で検証し, *in vivo*