

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

血液製剤安定確保のための
人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究

(研究課題番号：H18-医薬-一般-021)

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 四津 良平
(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 19 (2007) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書 1 - 5

四津 良平（慶應義塾大学 医学部 教授）

II. 分担研究報告書

1. 四津 良平（慶應義塾大学 医学部 教授） 6 - 8

2. 相川 直樹（慶應義塾大学 医学部 教授） 9 - 12

3. 堀之内 宏久（慶應義塾大学 医学部 講師） 13 - 17

4. 坂本 篤裕（日本医科大学 麻醉学教室 教授） 18 - 22

5. 小松 晃之（早稲田大学 理工学研究所 助教授） 23 - 37

6. 大鈴 文孝（防衛医科大学校 第一内科学教室 教授） 38 - 43

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 44 - 47

IV. 研究成果の刊行物・別冊 48

血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究

主任研究者 四津 良平 慶應義塾大学医学部 外科 教授

研究要旨

救急医療において輸血は必要不可欠な手段であり、治療のシステムの重要な要素であることは明らかである。しかし、輸血を行う際には、患者の血液型を検査し、交差試験を行うことにより安全性が確保できるが、検査と交差試験を行う時間的余裕が得られない症例も存在する。血液型に関係なく、時と場所を選ばずに使用できる人工赤血球の開発は救急医療においてきわめて重要な意義を持っている。本研究では人工酸素運搬体の特徴を最大限活用した臨床的適応を確立するために各種疾患モデル動物を用いた応用研究を行うと同時に救急疾患の成立機序と治療への反応を解析することを目的としている。

体外循環回路の充填液として人工酸素運搬体を利用する検討では、① Hb小胞体(HbV)を用いることにより高次脳機能が保持できることが明らかとなったが、本研究では実際に脳血流、脳組織内酸素分圧にどのような変化が生じるかについて検討すべく、動物モデルを作成し、脳血流、脳組織酸素分圧を安全にかつ簡便に測定できる系を開発した。

出血性ショックの蘇生液としての検討では、② 主用臓器における生体反応および低酸素に対する反応の解析を行なった。心、肺、肝、腎、脾のTNF α およびHIF-1 α の遺伝子発現プロファイルを経時的に検討した結果、mRNAの発現はTNF α およびHIF-1 α ともにショック後24時間でピークとなり、肺で高値であった。HbV投与群ではHIF-1 α の発現はLactate Ringer液を投与した群と同様の変化を示し、HbVの大量投与がProinflammatory proteinの発現を増強しないことが明らかとなった。③ 出血性ショックでは臓器血流が阻害、途絶した後の再灌流を意味し、蘇生により虚血再灌流障害を生じる可能性がある。一酸化炭素を結合させたHbVで蘇生を行ったところ、HbVは経時的にCO体からオキシ体へ変換されること、また体内で徐放されたCOにより再灌流障害低減が低減される傾向が認められた。また、④ 大血管損傷や腹腔内臓器損傷で認められる制御不能出血に対する治療として人工酸素運搬体の効果について検討すべく、動物モデルを作成し、検討した。大血管損傷モデル、腹腔内臓器損傷モデルのそれぞれの特徴を明らかにし、今後の研究に活用する。

虚血性疾患の対応として、⑤ 心筋虚血に対するHbVの影響を解析するためにラット心を用いたランゲンドルフ灌流を実施し、30分間の虚血状態をはさんで30分の灌流を行い、細胞内の解糖系について検討したところ、HbV灌流群ではGlucose濃度が上昇していたが、Glycogen、解糖系酵素には影響がなく、HbVによる解糖系の抑制について更に検討する必要があると考えられた。⑥ 有茎皮弁内の虚血については、微小循環を改善するため、酸素親和性が高いHbVを負荷投与したところ、血行動態、血管透過性、組織内酸素分圧の向上が認められた。⑦ 完全合成系人工酸素運搬体(アルブミンヘム)の酸素結合能は活性中心であるヘム構造の精密制御により調節可能と考えられており、適応症に即した酸素親和度を有する製剤を選択

することが可能である。ヘムの構造を $\alpha^3\beta$ 型としたヘムを作成、簡便な合成が可能となった。

炎症性腸疾患の治療には炎症局所である腸粘膜の微小循環環境を改善する必要がある。そこで、⑧ HbVが微小循環を改善し、炎症を軽減可能かについて検討した。DSSによる腸炎を惹起させたマウスを用いてHbV投与の効果を、生食投与群を対照として大腸炎活動指数、体重変動、病理組織学的改善度について検討した。HbV投与により体重減少が緩和される傾向にあり、急性期の安全性を確認することができ、更に検討を行なうことが必要と考えられた。

分担研究者

相川 直樹 慶應義塾大学医学部救急医学 教授
堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部外科 講師
坂本 篤弘 日本医科大学医学部麻酔科 教授
小松 晃之 早稲田大学理工学研究所 助教授
大鈴 文孝 防衛医科大学第1内科学 教授

A. 研究目的

人工酸素運搬体の臨床応用は輸血代替が最重要課題であるが、製剤の性質(酸素運搬能、小粒径等)を利用すれば、種々の救急疾患に新たな治療法をもたらす可能性がある。本研究は人工酸素運搬体の特徴を最大限活用した臨床的適応を確立するため各種疾患モデルを用いた応用研究を行うことである。今年度は以下の点を明らかにすることを目的とした。

①体外循環の補填液としての人工酸素運搬体(Hb小胞体: HbV)を用いた場合の脳血流と脳組織酸素分圧の変化を検討する。このために小動物による測定系の確立を行う。

②出血性ショック時には臓器灌流の低下から、低酸素に関連する蛋白の発現や炎症性サイトカインの産生増加が指摘されている。これらの因子の経時的な変化と、HbV投与による蘇生での変化について検討する。③一酸化炭素は少量であると血管拡張や血管内皮保護などの重要な役割を果たすと考えられており、出血性ショック後の蘇生液として一酸化炭素加したHbVを検討する。④外傷性ショック蘇生液としての人工酸素運搬体の有効性は以前の研究で明らかにされているが、制御不能の出

血を伴うショック状態に使用した場合、生存や臓器機能の保持にどの程度有効かについて検討する。

⑤心筋虚血に対するHbVの保護効果をランゲンドルフ灌流試験から明らかにしてきたので、その機序を解糖系酵素の動態から検討した。⑥有茎皮弁の中の血流分布は一様ではなく、虚血部がある。この虚血部を持つ有茎皮弁を用いて、酸素親和性の高いHbVの効果について炎症性サイトカインの評価を行なって検討する。⑦ヘムの構造を $\alpha^3\beta$ 型としたヘムを作成、このヘムを用いたアルブミンヘムを製造して酸素親和性を含む物理化学的な性質を検討する。

⑧炎症性腸疾患では炎症の進行とともに血便、下血が現れ、貧血が進行し、輸血が必要となる疾患である。炎症成長疾患による貧血に対するHbVの安全性および有効性についてマウスに実験的腸炎モデルを作成、HbVの形状脈投与の安全性と有効性について検討を行う。

B. 研究方法

本年度は動物実験を中心として以下の方法を用いた。①300gのWistar系ラットを用い、血液をヘパリン化して体外循環を確立し、レーザードップラー血流計を用い経頭蓋にて無侵襲で脳血流、脳組織酸素分圧を測定する方法を確立する。②300g程度のSDラットを用い、脱血による出血性ショックを惹起し、15分にわたりショックを維持し、乳酸リンゲル液あるいはHbV分散液で蘇生を行う。蘇生後168時間まで経時的に犠牲死させ、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出、TNF α とHIF-1 α の遺伝子

発現についてRT-PCRを用いて検討した。③一酸化炭素を結合するHbVを、出血性ショックを惹起したラットに投与し、蘇生を行った。対照群としてCO化したラット洗浄赤血球、酸素結合HbV、通常のラット洗浄赤血球を用いた。出血性ショックを惹起した後、15分放置してから試料を頸静脈より投与し、6時間まで血行動態を観察、HbCOレベルを測定、6時間後に採血し、生化学検査を施行した。④Wistar系ラット360g程度を用い、全身麻酔下に大血管損傷モデルとして、開腹の後、腹部下行大動脈を露出して、種々の損傷を与え、制御不能出血を作成、出血性ショック状態を惹起し、蘇生の方法を検討できるモデルを作成する。また、臓器損傷モデルとして脾臓を損傷、制御不能出血を作成する。⑤Wistar系ラット心を用いランゲンドルフ灌流を実施した。Krebs-Henseleit(KH)液で灌流し、30分の虚血をはさんだ後再灌流を30分間行った。実験群は虚血前に10分間Hb小胞体あるいは空小胞体を用いて灌流を行った。30分の再灌流後心臓を凍結、破碎して細胞質成分を抽出し、解糖系酵素活性およびGlucose、Glycogen濃度を測定した。⑥ Syrian Golden Hamsterを用い、背部皮膚に小動脈と小静脈の対で栄養される有茎皮弁を作成した。この皮弁中の血管の走行を、同定後虚血部を作成するため、一部の動静脈を結紮切離し、虚血部位を作成した。顕微鏡下に血流速度および管径、毛細血管の透過性を観測した。また、組織酸素分圧はClark電極を用いて測定した。酸素親和性の高いHbVとしてP₅₀が9TorrのHbVを作成、静脈内に投与して虚血部の変化を観測した。⑦ヘムの構造を $\alpha^3\beta$ 型としたヘムを作成、このヘムを用いたアルブミンヘムを製造して酸素親和性を含む物理化学的な性質を検討した。⑧野生型C57BL/6マウスに1.3%dextran sulfate sodium (DSS)を5日間経口投与すると下痢や血便を生じ急性大腸炎を発症する。このモデルにDSSの投与1日前より1日おきにHbVを形状脈投与し、大腸炎活動指数、体重変動、病理組織学的変化、血清アミロイドAを測定した。

C. 結果

動物実験及び*in vitro*の実験より以下の結果が得られた。①経頭蓋にて無侵襲で脳血流、脳組織酸素分圧を測定する方法については血流測定にはレーザープローブが頭蓋に対して直角に当たることが必要不可欠であることが明らかとなり、300gのWistar系ラットを用いる場合はプローブ固定のため皮膚の切除とハーネスの使用を必要とすることが明らかとなった。実験では血液をヘパリンかするため、侵襲的な手技(頭蓋・硬膜の切除)、り、皮膚の切除と頭蓋へのプローブの直接固定、自作のハーネス使用で問題を解決した。低侵襲で経時的な測定も可能となった。次年度での体外循環を使用した研究を継続して行う。

②SDラットの脱血による出血性ショック後の蘇生にHbVを使用しその後の各臓器でのTNF α 、HIF-1 α の遺伝子発現は肺で最も高く、24時間後にピークに達することが明らかとなった。乳酸リンゲル蘇生群とHbV蘇生群の間には遺伝子発現には優位さを認めなかった。③出血性ショックの蘇生にCO結合HbVを用いると、蘇生効果は通常のHbVとほぼ同等であった。対照群として使用したCO結合洗浄赤血球でも蘇生効果は同様であった。HbVあるいは洗浄赤血球に結合した一酸化炭素は3時間あるいは6時間で正常値レベルまで減少し、Hbより解離して空気中に呼気とともに放出されるものと考えられた。臓器損傷の指標であるAST, ALTはCO結合HbVでは増加が抑制され、臓器損傷を抑制する効果があると考えられた。④大血管損傷モデルでは損傷を作成する針の直径を変更することで損傷の程度を変更することが可能であった。24G新で損傷を作成すると初期の出血性ショックにより死亡する動物があるが、徐々に血圧は回復するものの血圧の低い状態が続くモデルを作成することが可能であった。開腹、脾臓を切開する臓器損傷モデルでは、血圧の減少は緩やかで、60分後でも平均血圧は86.7mmHgに保たれていた。実験終了時に再開腹

すると、出血は持続していたが脾臓断端は血餅で覆われており、ごく少量の出血を認めるのみであった。⑤虚血再灌流を行った心筋組織中のGlucose含量はHb小胞体で灌流した群でKrebs液で灌流した群と比較して高値であった。Glycogenに関してはばらつきが大きく、有意差は認められなかった。一方、細胞内の解糖系の酵素活性（Hexokinase, Pyruvate kinase, LDH）は対照群、実験群で変化は認められなかった。⑥有茎皮弁中の虚血部位の血管系は虚血状態では拡張したが、HbV負荷投与により拡張は抑制された。有効毛細血管密度は虚血組織で40%減少したが、HbVを投与すると虚血領域でも有効毛細血管密度は増加し、血流速度も120%の増加を示した。組織酸素分圧は虚血領域でHbV投与により上昇した。組織中の炎症性サイトカインの発現を呈する細胞はHbVの投与により減少し、炎症の抑制に働いていることが伺われた。⑦ヘムの構造を $\alpha^3\beta$ 型としたヘムを作成、このヘムを用いたアルブミンヘムを製造して酸素親和性を含む物理化学的な性質を検討したところ、 $\alpha^3\beta$ 型では工程の短縮が可能であった。P₅₀は小さく、可逆的に酸素錯体を形成することが明らかとなり、新たな人工酸素運搬体としての機能があることが明らかで、ヘムの置換気構造を変化させることにより酸素親和性を変化させることが明らかとなった。⑧DSS投与マウスに対しHbVを投与したところ、生食投与マウスに比し、体重減少が抑制される傾向を認めた。大腸炎活動性指数も生食投与マウスに比し、HbV投与マウスでは5日目以降で低い値をとるようになった。病理学的評価および血清アミロイドA値の測定では生食投与群とHbV投与群に差を認めなかった。

D. 考察

以上の結果より①経頭蓋にて無侵襲で脳血流、脳組織酸素分圧を測定する方法が確立し、体外循環時の脳血流、および脳組織酸素分圧の変化について小動物モデルを用いて検討が可能となり、長

期にわたる解析も可能と考えられ次年度も研究を進める必要がある。②出血性ショック時の病態生理を解明する上で炎症細胞や血管内日における炎症性サイトカインの遺伝子発現と表現プロファイルを解明することは治療法の開発にも重要な役割を持つと考えられ、HbVによる蘇生がTNF α とHIF-1 α の遺伝子発現に抑制的に作用することはショックの治療で惹起される臓器灌流不全と嫌気性呼吸過程を抑制する可能性を示唆した。③出血性ショック蘇生液としてのCO結合HbVは通常のHbVとほぼ同等で、CO donorとしての働きと酸素運搬体としての働きを同時に発揮することが可能であった。CO donorとしては臓器損傷を抑制する効果があると考えられ、出血性ショックに対する新たな蘇生液としての検討が必要と思われた。④大血管損傷モデルでは晶質液、膠質液、HbVなどを用いて蘇生実験を行い、生存率の変動と、組織・臓器の酸素分圧の変動について検討する必要があると考えられた。また、脾臓損傷モデルでは腹腔内出血のモデルとして利用できる可能性があるものの出血性ショックの治療も出るとするには改良が必要であると考えられた。⑤ランゲンドルフ灌流によって心筋虚血を評価したところ、HbVで灌流した後に虚血再灌流を行うと心筋組織内のGlucose濃度が上昇したが、Glycogen濃度、解糖系酵素活性には変化が見られなかった。Hb小胞体を用いて灌流すると乳酸濃度が上昇することがわかっており、Hb小胞体で運搬された酸素はミトコンドリアで使用されると同時に解糖系の活性を抑制する可能性を示した。⑥有茎皮弁中の虚血部位の血流状態の改善、酸素分圧の改善を図ることが可能で、臨床応用も視野に入れた検討が重要と考えられた。組織中の炎症性細胞の活性を抑制している可能性があり、過度の炎症を抑制して治療効果を上げることが可能と考えられた。⑦ $\alpha^3\beta$ 型のヘムの用いて作成したアルブミンヘムでは物理化学的な特徴が解明され、生物学的な検討が必要と考えられた。⑧実験的急性腸炎モデルにおいてHbVの投与は炎症を緩

和する傾向を認めたが、病理組織学的な差異は軽度であり、この点でモデルを改良してHbVの効果についての懐石を行う必要があると考えられた。

E. 結論

平成18年度は新しい3年計画の1年目であり、救急医療におけるHbVの利用範囲を拡大することと多面的に有効性を評価する方法を確立することが求められた。多くの研究では次年度を見据えた方法論の確立と評価の点で進捗が見られた。臨床で直面している問題点を解明するために体外循環における脳血流と酸素分圧の変化、制御不能出血によるショックの治療など複雑な要素が組み合わさって起こる現象を要素ごとに検討するモデルが作成できたことは次年度の研究成果につながると考えられる。また、HbVの生体への影響を遺伝子発現の変動から評価する方法が確立したことは臨床での評価法の開発にもつながる画期的な戦略的知識であると考えられた。また、一酸化炭素は大量にあるとHbと強く結合し、細胞の呼吸を傷害するが、あらかじめHbに結合して投与すると、CO donorとして経時的にCOを放出し、放出した後は酸素運搬体として機能することが明らかとなり、新たな治療法として検討がなされるべき事項であると考え

られた。

虚血性疾患に対する治療に人工酸素運搬体を用いて組織の酸素代謝を改善させる可能性を模索するため、心筋の虚血状態に対するHb小胞体の影響を評価した。虚血直前にHb小胞体を用いて心筋灌流を行うと、組織内のGlucose濃度のみ高い値を呈するものの解糖系の酵素活性には影響を与えなかった。Hb小胞体による灌流を行うと乳酸値の上昇が認められたことから、解糖系に抑制的な作用を示す可能性が示唆された。

新規な分子構造を有するアルブミンヘムの登場は今後用途に応じて分子を改変してゆくモデルになると考えられ、生体への投与による効果についての成果が待たれる。

最後に実験的急性腸炎モデルに対するHbVの応用はまったく新しい概念から派生した治療法でさらに詳しい検討が必要である。

次年度よりは本年度の研究を継続して発展させると同時に新たな課題(移植臓器における臓器保存のための灌流液としての検討や、救急蘇生時にどの程度の速さで輸液を行うのが生存率の向上に有利なのかについての検討など)に関しても検討を進める必要がある。

分担研究報告書

血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究

分担課題：人工酸素運搬体を用いる体外循環における脳血流の恒常性

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

研究要旨

新生児や乳児の開心術の成績は近年飛躍的に向上しているが、一般的には人工心肺回路の充填液として輸血が必須である。これは、低体重の患者において無輸血充填を行った場合、高度の血液希釈が生じ、特に酸素需要の大きな脳の不可逆的障害を来す可能性が高いためである。一方で、輸血には感染症、移植片対宿主反応、免疫抑制、炎症性生体物質活性化による臓器障害といった合併症の危険を伴う。こうした臨床上のジレンマの一解決手段として、我々は人工酸素運搬体であるHb小胞体（HbV）に着目した。平成15年度より行った研究により、ラット人工心肺モデルにおいて、人工心肺回路をHbVで充填することにより高次脳機能が維持されることを証明した。これはHbVの充填により末梢組織への酸素運搬が保持されたためと考えられ、HbVの有用性が明らかとなった。平成19年度は、同モデルにおいて、HbV充填が脳血流量に及ぼす影響を求めることを目的としてそのモデルの確立をめざした。

A. 研究目的

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

このために、現在体重10kg以下の患者に体外循環を行う場合、赤血球輸血は避けられない状況にある。しかし一方で、輸血による感染症、移植片対宿主反応、免疫抑制といった合併症のリスクを伴い、社会的にも大きな問題となっている。また、炎症性生体物質の遊離を促進することによる脳障

害の発生も指摘されており、できるだけ輸血を避けるように努めるべきである。

この臨床上のジレンマの解決手段のひとつとして、我々は、人工酸素運搬体であるHb小胞体（HbV）に着目した。現時点のHbVは半減期が約20から30時間と短いことが欠点のひとつになっている。しかしながら人工心肺運転中に生じる血液希釈状態という特殊な環境はおおよそ数時間であり、その数時間だけ血液の役割を果たし、その後速やかに代謝される現在のHbVは小児心臓外科の立場から考えると臨床上のジレンマを解決に導く大きな利点となる。すなわち、HbVの欠点を利点として活用するという逆転的発想により本研究は成り立っている。

平成18年度は15～16年度の人工心肺モデルにおける具体的な脳血流量の測定モデルの確立を目指

した。

B. 研究方法

1. ラット慢性人工心肺モデル

ローラーポンプと特製膜型肺を用いて人工心肺回路を作成し(Fig. 1)、回路内に5%アルブミンを充填した群 (HbV (-) 群)、同種血を充填した群 (輸血群)、Hb小胞体を充填した群 (HbV (+) 群)、偽手術群 (コントロール群) の4群に分けて実験を行う。体重450g前後のSDラットをセボフルレンにて全身麻酔し、14G静脈留置針にて気管内挿管する。挿管後人工呼吸器管理とする。人工心肺のカニューレーションとして、脱血は経右内頸静脈的に右房から、送血は尾動脈を介して行う。人工心肺の運転は常温下、無拍動送血法で200ml/kg/minの流量で90分間行う。回路内充填量は60mlとする。

2. 各群の充填量と組成の組み合わせ

1 群	HbV (-) prime 群	n=10
	充填量60ml (充填は5%アルブミン)	
2 群	輸血群	n=10
	充填量60ml (充填は同種血)	
3 群	HbV (+) prime 群	n=9
	充填量60ml (充填はHb小胞体)	
4 群	コントロール群 (sham surgery)	n=9
	充填量60ml	

3. レーザードップラー血流計

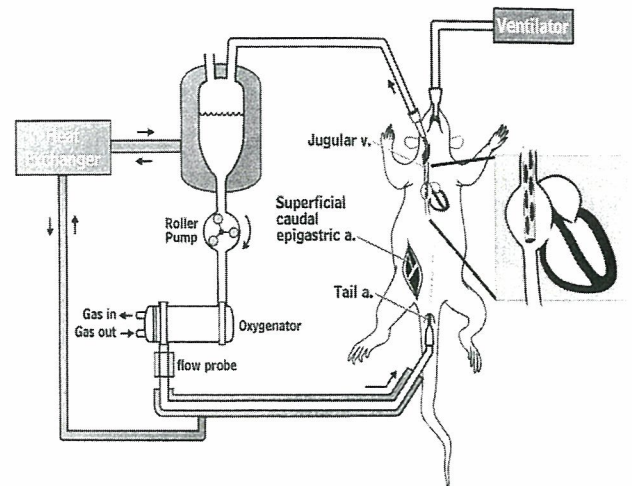


Fig. 1 ラット慢性人工心肺モデル

レーザードップラー血流計による脳血流測定モデルは数種類報告されているが、ラット頭蓋に孔を作成した上で測定する方法では頭蓋骨切断端からの人工心肺運転中のフルヘパリン化状態で出血量が多くなることは不可避であるため、頭蓋を温存した方法をめざすこととした。

レーザードップラー血流計により血流量の測定を行う。人工心肺充填液を人工赤血球・5%アルブミン・同種濃厚赤血球の3種にて比較を行う。その際に酸素飽和度も測定を行うことで、人工赤血球投与時の脳血流および体外循環時の酸素運搬能についての情報を得る。

C. 結果および考察

平成18年度はラットの脳血流測定法の確立を主に行った。ドップラー血流計はオメガフロー

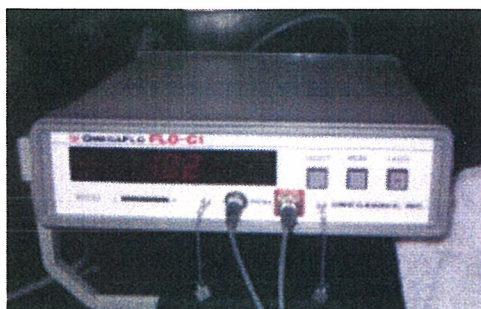


Fig. 2. レーザードップラー血流計(FLO-C1, オメガウエーブ社製)(左)および、接触型フロープローブ (DS型) を頭蓋骨露出部に接触型フロープローブを密着した状態(右)。

FLO-C1(オメガウエーブ社製)と接触型フロープローブ(DS型)を用いて体重260gのSDラットにて行った。セボフルレンを用いて麻酔導入後、heat cutterを用いて頭頂部の頭皮を約直径 1 cm の円形に切開し、更に骨膜も切開し、頭蓋骨を露出したが、頭蓋骨自体は温存した。controlとして測定したSDラットの下肢の血流量測定値は13.6であった。頭蓋骨露出部に接触型フロープローブを密着するための工夫を行い、17.0の血流量を安定して測定することが可能であった。また、ラットを挿管し、人工呼吸器管理とし仰向けにしても血流量は変化せず測定することができた。

D. 結論

ラットの頭蓋骨を温存しても、適切な測定機器と測定方法を選定することによって脳血流が測定可能であった。よって、この方法により人工心肺運転中のフルヘパリン化状態においても、脳血流を測定することが可能であると考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1 論文発表

1. M. Yamazaki, R. Aeiba, R. Yozu, K. Kobayashi. Use of hemoglobin vesicles during cardiopulmonary bypass priming prevents neurocognitive decline in

rats. *Circulation* 114, I220-I225 (2006).

(解説)

1. 饗庭 了, 森田雅教, 心臓手術の実際. *Clinical Engineering* 17, 1116-11213 (2006).
2. 山崎真敬, 饗庭了, 四津良平, 小林紘一. ヘモグロビン小胞体を用いた人工心肺充填液による高次脳機能保護効果 -ラット人工心肺モデルによる検討- *人工血液* 14, 62-65 (2006)

2 学会発表

1. 保土田健太郎, 饗庭了, 四津良平/人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)を用いたビーグル犬人工心肺モデルにおける頸動脈血流量、脳酸素代謝量の検討/第13回日本血液代替物学会年次大会/2006.8.24-25./慶大医
2. 饗庭了, 四津良平/救急災害医療に対応できる人工赤血球の開発(体外循環に使用して高次脳機能を保持する)/平成18年度研究成果発表会「人工血液をつくる(7)」/2007.2.11/日本科学未来館、東京

F. 知的財産権の出願・登録情報

該当無し。

分担研究報告書

血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究

分担課題： 制御不能出血による出血性ショックの蘇生法の開発

分担研究者	相川 直樹	慶應義塾大学医学部 救急部 教授
	堀之内 宏久	慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 講師
	河野 光智	慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助手

研究要旨

鈍的外傷や鋭的損傷による大量出血に対しては外科的に止血を行うことが生存のためには必要条件となるが、救急施設へ到着するまでの蘇生処置をどのようにすべきかについては議論が多い。大量出血時には重要臓器への血流が著しく減少することによる低酸素状態と嫌気代謝が死亡と蘇生後の合併症の発生にかかわっていることが考えられている。制御不能出血は血管損傷による大量出血と、臓器損傷による大量出血とに分けられる。これらのモデルとして、大動脈損傷を起こしたラットを、臓器損傷モデルとしては脾臓損傷モデルを作成、蘇生の方法を検討した。大動脈損傷モデルでは大動脈外膜まで十分に剥離した後に24G針で大動脈を穿刺し、ショックを起こすモデルを開発した。致死率80%、死亡は2時間以内に認められた。また、脾臓損傷モデルでは血圧の低下は認めるが、4時間までの観察で死亡率は0%であった。動物モデルのさらなる改良は必要と考えられるが、これらのモデルを用いて蘇生に人工酸素運搬体を用いることによって臓器傷害を低減して生存率を向上させる方法について検討する。

A. 研究目的

外傷に対して輸液、輸血を用いてどのように治療するかについてはある程度のコンセンサスが得られており、欧米では外傷現場において輸液ルートを確認して輸液を行い血圧を維持しつつ救急医療施設へ搬送することが通常行われている。しかし、輸液が生存率の向上に役立っているかについてはいまだに明らかな確証が得られていない。大量出血、特に制御不能の出血を有する外傷症例では血圧の低下を放置しても救急施設へ搬送して外科的処置を優先させるのか、各種の輸液製剤を用いて血圧を維持しておいたほうがよいのかについてBickell、CornwellらがRetrospectiveな検討を行い、輸液自体が生存率を下げる原因ではないかとの報告している。蘇生液にどのような輸液を用いるか

については2004年に報告されたCochran reportで詳述されており、出血性ショックの蘇生において晶質液と膠質液で生存率に有意差がないとしている。臓器の酸素代謝の面から出血性ショックを考えると、心拍出量、Perfusion pressureの減少とともに酸素供給が低下し、嫌気呼吸が増加、臓器機能が低下する。この低下した状態が進むと回復不能な状態に陥る。大量出血時には皮下も含め、臓器血流が著しく減少するため、有効なPerfusion pressureを保つために輸液が必要であるが、輸液のみでは酸素供給を保つことはできず、嫌気呼吸状態を脱却することはできない。Perfusion pressureが低い状態でも組織の酸素代謝を低下させない方策を講じるとすると、輸血を行うのがよいことは明らかであるが、救急の現場、搬送中に輸血を行うことは不

可能に近い。そこで、人工酸素運搬体を用いて組織の酸素代謝を改善させ、生存率の上昇につながるかを検討することを目的とした。

制御不能出血性ショックモデルとしては大血管損傷モデルと腹腔内臓器損傷モデルを確立することを目的とする。

B. 研究方法

雄性Wisterラット(360–460g)を用いた。セボフルレンの吸入麻酔を行い、ラットを仰臥位に固定、体温を一定に保つためにDeltaphase isothermal pad (Braintree, MAS, USA)を使用した。ラットは挿管せずに自発呼吸下に吸入麻酔を行い、実験を遂行した。頸部を露出、SP31(Polyethylene tube, I.D. 0.5mm, O.D. 0.8mm, 夏目製作所, Tokyo, Japan)を用いて右頸動脈に動脈ライン、右頸静脈に静脈ラインを留置した。動脈ラインはPolygraph system (LEG1000, Nihon Koden, Tokyo, Japan)に接続し、圧トランスデューサー (Becton Dickinson) に接続し、連続して観測した。

1. 大血管損傷モデル

腹部正中切開を行い、小腸を左方へ展開、生食ガーゼで覆った。後腹膜を切開し、腹部下大静脈および大動脈を剥離、大動脈にプラスチックシート(3×10mm)を挿入し、周囲臓器、組織が付着しないようにIsolateした。

血管損傷として、切断、21G針で穿刺、24G針で穿刺の3種類の操作を行い、平均動脈圧、脈拍数を測定した。出血性ショックの程度を判定した。

2. 臓器損傷による制御不能出血モデル

Evgenyらの報告に準じ、脾臓を切開することで制御不能出血モデルを作ることとした。まず腹部正中切開を行い、脾臓を創外へ引き出し、脾門部の血管を損傷しないように脾臓を3分割した。これにより脾臓実質より出血が始まるのを確認した後、脾臓を腹腔内に還納し、腹壁を絹糸3針で軽く縫合

した。平均動脈圧、心拍数を測定し、出血性ショックの程度を判定した。

C. 結果および考察

1. 大血管損傷モデル

a. 大動脈切断モデル(n=3)

切断前の血圧は 109 ± 12.3 mmHg 心拍数 325 ± 22.9 /minであったが、1分後には血圧 16.3 ± 7.76 mmHg、心拍数 195 ± 93.7 /minとなり、5分後には血圧測定不能、2匹では心停止、死亡を認めた。残る1匹も7分後に心拍停止を認めた。死亡後の剖検では、腹腔内に9.2gの凝結塊を認め、切断部を確認すると、止血血栓等ははっきりしなかった。

b. 21G針による大動脈穿刺に伴う出血のモデル(n=2)

穿刺前の血圧は $125/110$ mmHg(平均 122 mmHg) 心拍 345 /min、1分後 $14/6$ mmHg心拍 90 /min、5分後血圧測定不能、心拍も停止し、大動脈切断の際と同様の経過をたどったため、このモデルによる更なる検討を中止した。

c. 24G針による大動脈穿刺に伴う出血モデル(n=3)

腹部下大動脈穿刺前の平均血圧は 101.6 mmHg、心拍数は 330 /minであった(**Fig. 1**)。穿刺後2分で平均血圧は 20 mmHg、脈拍も 300 /minに低下、5分後は 28.7 mmHg、 263 /minであった。10分後の平均血圧は 41 mmHgであった。1匹は13分後に心停止が確認されたが、残りの2頭は緩徐に回復し、30分後平均血圧 79 mmHg、心拍 319 、60分後平均血圧 87 mmHg、心拍 352 とショックが代償されていた。2時間後に過量のネンブタールの静脈内投与によって犠牲死させ、腹腔内を検するに、出血量は生存例で平均 6.2 gであり、大動脈損傷部には血栓を生じ、止血が完成していた。

2. 腹腔内臓器損傷モデル

脾臓損傷モデルでは開腹し、脾臓を損傷する直

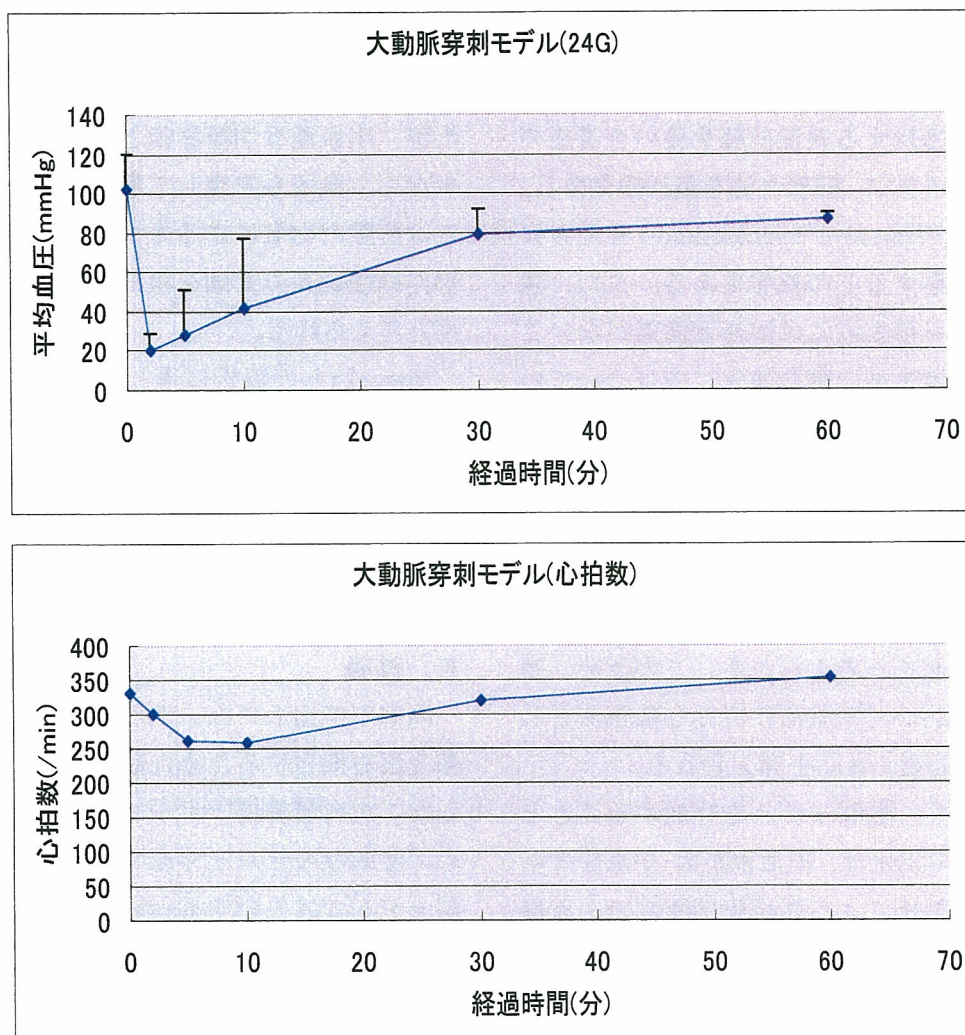


Fig.1. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate. After injury, MAP decreased and gradually recovered. However, MAP didn't recover to quiescent level.

前の平均血圧は平均96mmHgであった。2分後、98.3mmHg、5分後94mmHg、10分後90.7mmHg、30分後93.7mmHg、60分後86.7mmHgと血圧の低下は認めるもののショック状態に陥ることはなかった。実験終了後に犠牲死させ、再開腹して脾臓を検すると、出血は持続していたが、Fibrin netで脾臓断端が覆われており、ごく少量の出血を認めるのみであった。腹腔内への出血は6mL以下であった。脈拍数の変動も損傷直後に変動するものの、経過中大きな変化を認めなかった。以上より、脾臓のみを切開する損傷モデルでは制御不能出血をモニターする動物も出るとはなり得ないと考えられた。

D. 考察

制御不能出血の初期治療がどうあるべきかは1990年代より多くの研究者による基礎・臨床研究を通じて議論がなされている分野である。本邦においては救急救命士は気道の確保としての挿管は行うものの、輸液を行いながら救急搬送することは通常行わない。このため、救急搬送における蘇生治療がどのようにあるべきかについては臨床的な検討が行われることが少なかった。欧米では輸液蘇生をしつつ救急搬送することが一般的に行われており、血圧を維持しようと輸液を続けること

は出血量をかえって増加させ、臓器への酸素運搬が減少し、生存に結びつかないという意見がある。出血による高度のショック症例で、臓器血流が長時間にわたって途絶する状況は蘇生後の合併症の点からも避けるべきで、臓器血流を最低限保持し、輸液量を抑えるPermissive hypotensionの考え方により究明率が上昇するとの報告もある。また、現在使用されている蘇生液には酸素運搬能がないことが輸液による蘇生後の臓器障害に結びついていいる可能性も指摘されている。

本研究グループで研究が進められているHb小胞体(HbV)は酸素運搬を伴う輸液製剤なので、Permissive hypotensionの状況下でも臓器に酸素供給を行って、臓器機能の虚血による不可逆的傷害を防ぐ可能性があると考えられる。このため、制御不能の出血においても救命に有効な蘇生液として使用される可能性があると考えられる。

本研究ではまず、動物モデルを作成することとした。制御不能の出血は、出血源が大・中血管である場合と、臓器損傷による損傷臓器断端である場合がある。出血という点では双方ともに同様の循環動態を取るが、止血機構や重要臓器の血流の点からは異なった病態生理学的変化を呈すると考えられる。そこで、孤の双方についての動物モデルを作成することを試みた。

大血管損傷モデルでは大動脈穿刺モデルで穿刺針を細くすることによって安定したショック状態を作成することが可能であると考えられた。生存例では犠牲死時に大動脈穿刺部よりの出血は止血していると思われた。損傷部の止血は血圧の低下と損傷部の血栓形成との双方の効果であると考えられた。この事実より、大動脈損傷モデルでは制御不能出血のために死亡にいたる例と、自然に止血されて生存する例がある一定の割合で発現すると思われ、長時間の観察で死亡数が増加する血管損傷モデルも確立する必要があると考えられた。

他方臓器損傷モデルでは、脾臓損傷モデルにおいて、120分観察後でも脾臓切開断端よりの出血が認められ、制御不能の出血であることは確認できたが、出血量は切断直後とは比較にならないほど少なく、血圧も安定して推移した。このモデルでは腹腔内出血による血清学的な変化あるいは血管作動性物質の変動を検討するモデルとしては有用と考えられた。

Masuokaらの報告に準じて肝左葉の65%を切除するモデルでは損傷後60分で平均血圧が70mmHg以下に低下したので、早期損傷による制御不能出血モデルとしてはこちらの方法を採用すべく、再検討すべきであると考えられた。

E. 結論

制御不能出血にたいする人工酸素運搬体による蘇生法を開発するために動物モデルを作成し検討した。大血管損傷モデルでは生存率を検討するために至的なモデルを作成することができ、臓器損傷モデルでは生化学的な検討にふさわしいモデルの作成が可能であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

Suzuki M, Hori S, Tomita Y, Aikawa N. Orthostatic decrease in cardiac chaos during the head-up tilt test in patients with vasovagal syncope. *Circ. J.* 2006. 70, 902-8 (2006).

H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

該当なし

分担研究報告書

血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究

分担課題：Hb小胞体の炎症性腸疾患治療への応用

分担研究者 堀之内宏久 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助教授

河野 光智 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助手

研究要旨

大腸及び小腸の粘膜に慢性の炎症または潰瘍をひきおこす原因不明の疾患の総称を炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease : IBD)という。通常、潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis)とクローン病(Crohn's Disease)のことをさす。病気の活動期に血便、下血により貧血が進むため、赤血球輸血の対象となっている。将来的にHb小胞体(HbV)の投与対象となることが予想されるため、炎症性腸疾患による貧血に対するHbVの安全性及び有効性に関する検討を行った。マウスに対してdextran sulfate sodium (DSS)を5日間投与して大腸炎を生じさせ、HbV投与を行ったところ、生理食塩水投与群と比較して大腸炎活動性指数と体重減少が改善される傾向にあった。投与後急性期の実験での安全性と有効性を確認することができた。

A. 研究目的

大腸及び小腸の粘膜に慢性の炎症または潰瘍をひきおこす原因不明の疾患の総称を炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease : IBD)という。通常、潰瘍性大腸炎とクローン病のことをさす。潰瘍性大腸炎は、20歳代を中心とした若年者に発症し、大腸に慢性的に炎症が生じて潰瘍ができ、血便、粘液便、下痢や腹痛などが良くなったり(緩解)、悪くなったり(再燃)を慢性的に繰り返す原因不明の病気である。病変部位は直腸を中心として始まり、大腸全体にまで広がることもある。一方、クローン病は、主に10～20歳代の若年で発症し、消化管に縦走潰瘍あるいは敷石を敷いたような潰瘍、粘膜が腫れたり、狭窄になったりする原因不明の病気である。この病変は口腔から肛門までの消化管のあらゆる部位に見られるが、小腸や大腸が主な病巣である。主な症状として腹痛、下痢、発熱、肛門病変などがある。潰瘍性大腸炎もクローン病

もともに特定疾患に指定されている。

潰瘍性大腸炎もクローン病も、いまだ原因が不明であるために根本的な治療法がないのが現状である。治療の目的は大腸粘膜の異常な炎症を抑えて症状をコントロールすることで、アミノサリチル酸製剤や副腎皮質ステロイド剤、血液中から異常に活性化した白血球を取り除く白血球除去療法、免疫抑制剤などである。内科的には治療できない腸閉塞、穿孔、大量出血などが生じた重症の場合は大腸切除、人工肛門造設の手術が必要となる。

Hb小胞体(HbV)は、動物投与試験では、出血ショック蘇生、高度交換輸血、体外循環において、十分な酸素輸送能が発揮できることが実証されている。潰瘍性大腸炎やクローン病の患者では病気の活動期に血便、下血により貧血が進むため、現在、赤血球輸血の対象となることが多い。将来的にHbVの投与対象となることが予想されるが、まだ炎症性腸疾患による貧血に対するHbVの安全性及び有

効性に関する検討はなされていない。本研究では、炎症性腸疾患動物モデルにHbVを投与して、炎症性腸疾患の治療における安全性と有効性を確認する。

B. 研究方法

1. 対象動物

野生型C57BL/6マウス、雌性、8～10週齢を使用する。マウスに1.3% dextran sulfate sodium (DSS)を5日間経口投与すると下痢や血便を生じ、急性大腸炎を発症する。

2. HbV投与方法

HbVは尾静脈から1回あたり20ml/kg注射する。DSSの投与開始日1日前より1日おきに4回HbVを投与する。比較対照として生理食塩水投与群(1回あたり20ml/kg)を作成する。

3. 主な観察・検査項目

HbVの投与終了後、2日目にマウスを犠牲死させる。それぞれ下記の項目を検討し、生理食塩水投与群(1回あたり20ml/kg)と比較する。

1) 大腸炎活動性指数 Disease Activity Index (DAI); 体重減少や下痢、血便の程度を評価する。体重減少は5段階、便の性状と血便は3段階でスコアをつけ、合計する。

2) 病理組織学; 大腸の潰瘍、炎症等の程度を10段階で評価する。

3) 血清アミロイドA (SAA) ; マウスの炎症マーカーとして有用である。

C. 結果および考察

1. 体重変化への影響 (Fig.1)

DSS投与によるマウス急性大腸炎モデルにおいて、HbV投与群ではコントロール群と比較して体重減少が抑制される傾向にあった。

体重の減少はDSS投与後3日目から始まり、生理食塩水投与群では6日目まで減少を続けたが、HbV投与群では4日目以降横ばいとなり体重が減少しなかった。群間で有意差は認められなかった。

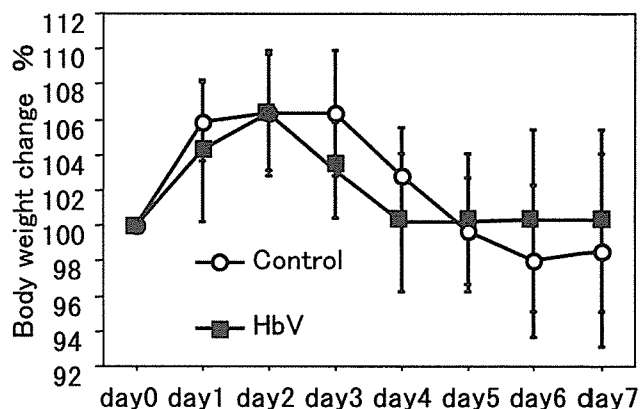


Fig. 1. Effects of Hb vesicle (HbV) on body weight change in a mouse DSS-induced colitis model.

2. 大腸炎活動性指数 (DAI)への影響 (Fig.2)

体重減少に加えや下痢、血便の程度を評価する大腸炎活動性指数も、HbV与群ではコントロール群と比較して改善される傾向にあった。有意差は認めなかったものの、5日目以降、指数はHbV投与群ではコントロール群よりも低い値であった。

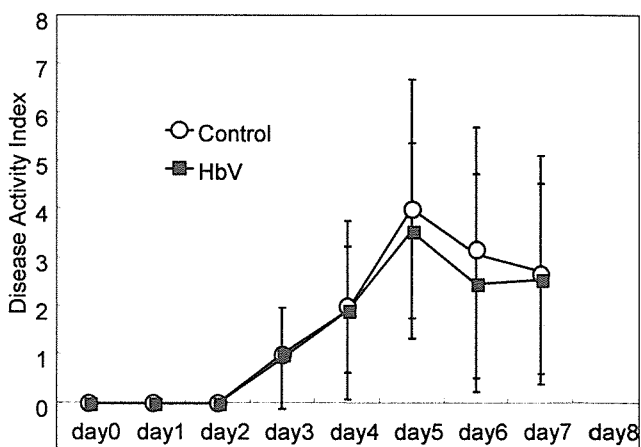


Fig. 2. Effects of Hb vesicle (HbV) on the activity of inflammatory disease in a mouse dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model.

3. 病理組織学評価 (Fig.3)

病理組織学評価による評価では有意差を認めなかった。

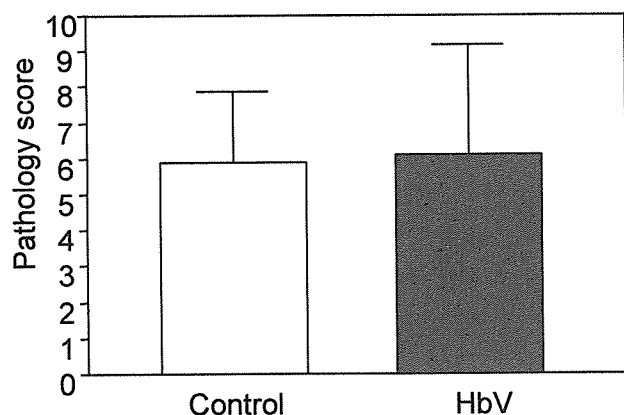


Fig. 3. Effects of Hb vesicle (HbV) on the score of pathological finding in a mouse DSS-induced colitis model.

4. 血清アミロイドA濃度 (Fig.4)

血清アミロイドAによる炎症の評価では有意差を認めなかった。

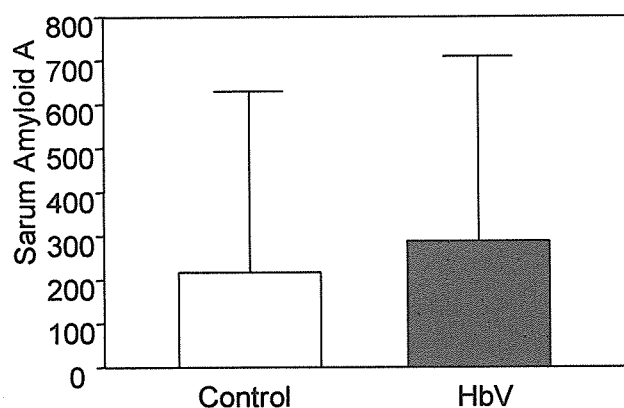


Fig. 4. Effects of Hb vesicle (HbV) on the level of serum amyloid A in a mouse DSS-induced colitis model.

D. 結論

HbVを用いた脱血ショックモデルでの検討は種々のモデルで検討され、有効性と安全性が確認されているが、本研究のような炎症性腸疾患による出血に対するHbV投与に関する検討は今までなされていなかった。そこで今回マウスを用いて大腸炎モデルを作成し、血便、下血を生じさせ、それによって進行する貧血に対するHbV投与の有効性と安全性を検討した。

DSS投与によるマウス急性大腸炎モデルにおい

て、HbV投与群ではコントロール群と比較して大腸炎活動性指数 DAIと体重減少が改善される傾向にあった。病理組織学評価と血清アミロイドAによる評価では改善を認めなかった。

生理食塩水またはHbVを隔日に経静脈投与することによって飲水量が減り、DSSの摂取量が少なくなり、そのため十分な大腸炎が起こらず、HbVの投与効果が十分得られなかった可能性がある。DSS投与の期間や濃度などを変更して更なる検討を継続する必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. Y. Goto, K. Terajima, T. Tsueshita, M. Miyashita, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, A. Sakamoto. Fluid resuscitation with hemoglobin-vesicle solution does not increase hypoxia or inflammatory responses in moderate hemorrhagic shock. *Biomed. Res.* 27, 283-288 (2006).
2. Y. Huang, T. Komatsu, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. PEGylated albumin-heme as an oxygen-carrying plasma expander: exchange transfusion into acute anemia rat model. *Biomaterials* 27, 4477-4483 (2006).
3. 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.* 35, 81-91 (2007).
4. T. Komatsu, Y. Huang, S. Wakamoto, H. Abe, M. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Influence of O₂-carrying plasma hemoprotein "albumin-heme" on complement system and platelet activation in vitro and physiological responses to exchange transfusion. *J. Biomed. Mater. Res. A* 80A, in press (2007).

(総説、著書など)

1. E. Tsuchida, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* 34, 581-588 (2006)
2. 小松晃之, 黄 宇彬, 王 榮民, 中川晶人, 山本尚志, 堀之内宏久, 小林絃一, 土田英俊. ポリ(エチレングリコール)修飾アルブミン-ヘム: 酸素輸送血漿増量剤としての溶液物性と機能. *人工血液* 14, 47-54 (2006).
3. 酒井宏水, 堀之内宏久, 山本学, 池田 栄二, 武岡真司, 高折益彦, 土田英俊, 小林絃一. ヘモグロビン小胞体(HbV)-リコンビナントアルブミン分散溶液による40%交換輸血: ラット脾臓内HbV代謝と造血に関する2週間の観察 (論文記事、Secondary Publication). *日本輸血細胞治療学会誌* 53, 47-55 (2007)
2. 学会発表
1. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicles (HbV) as artificial oxygen carriers: Recovery after acute hemodilution with HbV suspended in recombinant human serum albumin for 14 days / 52nd Annual Conference of ASAIO / 2006. 6. 8-10 / Chicago, USA.
2. Y. Izumi, M. Yamamoto, K. Takeuchi, M. Watanabe, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Modification of radiation response in Lewis lung carcinoma by administration of hemoglobin vesicle / 52nd Annual Conference of ASAIO / 2006. 6. 8-10 / Chicago, USA.
3. 池田達彦, 堀之内宏久, 井澤奈緒子, 泉陽太郎, 河野光智, 渡辺真純, 川村雅文, 酒井宏水, 土田英俊, 小林絃一 / Beagle犬を用いた50%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および酸素運搬能の評価 / 第13回日本血液代替物学会 / 2006.8.24-25 / 慶大医, 東京
4. 泉陽太郎, 山本学, 竹内健, 渡辺真純, 堀之内宏久, 寺村裕治, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊, 小林絃一 / 人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による固形腫瘍の酸素化 / 第13回日本血液代替物学会 / 2006.8.24-25 / 慶大医, 東京
5. 小松弘嗣, 佐藤夏枝, 太田勝次, 松浦昭宏, 堀之内宏久, 小林絃一 / ヘモグロビン小胞体の脳梗塞における有効性に関する基礎的検討 / 第13回日本血液代替物学会年次大会 / 2006.8.24-25 / 東京 慶應義塾大学
6. E. Tsuchida, H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi / Hemoglobin-Vesicles as Artificial Oxygen Carriers: Present Situation and Future Visions. (INVITED LECTURE) / International Visions on Blood Substitutes / 2006.9.17-20 / Parma, Italy.
7. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Blood Exchange with Hemoglobin-Vesicles Suspended in Recombinant Albumin: Profiles of hematopoiesis and metabolism of HbV. (INVITED LECTURE) / International Visions on Blood Substitutes / 2006.9.17-20 / Parma, Italy.
8. 酒井宏水, 堀之内宏久, 土田英俊, 小林絃一 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)による50%出血ショック蘇生後の回復過程 / 第44回日本人工臓器学会大会 / 2006.10.31-11.2 / パシフィコ横浜
9. 泉陽太郎, 山本学, 竹内健, 渡辺真純, 堀之内宏久, 寺村裕治, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊, 小林絃一 / 人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による固形腫瘍の酸素化 / 第44回日本人工臓器学会大会 / 2006.10.31-11.2 / パシフィコ横浜
10. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Ikeda, K. Sou, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physiological Capacity of RES for the Degradation of Hb-vesicles (Artificial O₂ Carriers) after Massive Intravenous Doses by Daily Repeated Infusions for 14 Days. / International Liposome Society Annual Meeting 2006 / Dec. 8-12 / London, UK.

11. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida.
/ Hb-vesicles suspended in recombinant human
serum albumin (rHSA) for fluid resuscitation from
hemorrhagic shock. / International Liposome Society
Annual Meeting 2006 / Dec. 8-12/ London, UK.
12. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi
/ Exchange-transfusion with Hb-vesicles (HbV)

suspended in recombinant human serum albumin
(rHSA) solution: degradation of HbV and
erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks../
International Liposome Society Annual Meeting
2006 / Dec. 8-12/ London, UK.

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

血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体の救急医療への応用に関する研究

分担課題：ラット出血性ショックモデルにおけるHb小胞体の輸液蘇生の生体反応
主要臓器における炎症反応と低酸素反応

分担研究者	坂本 篤裕	日本医科大学	麻酔科	教授
	寺嶋 克幸	日本医科大学	麻酔科	講師
	杖下 隆哉	日本医科大学	麻酔科	助手
	後藤 吉次	日本医科大学	麻酔科	助手

研究要旨

出血性ショックとそれに引き続く輸液蘇生に伴う各臓器の炎症反応や低酸素反応の違いと、輸液蘇生の輸液剤としてのHb小胞体(HbV)分散液の影響を調査することを目的とした。雄SDラットを対象とし、sevofluraneによる全身麻酔下に28mL/kgの脱血後、脱血量に対し、1) 3倍量の乳酸加リンゲル液、または 2) 等量のHbV小胞体分散液で輸液蘇生し、2、24、72、168時間後に犠牲死させた。摘出した心臓・肺・肝臓・腎臓・脾臓のTNF- α とHIF-1 α のmRNAを測定した。HbV分散液は乳酸加リンゲル液と同様の炎症反応を示した。TNF- α のmRNAは肺で強く発現し、研究期間中経時的に増強した。HIF-1 α のmRNA発現は蘇生後24時間でピークを示し、肺で強い発現を示した。出血性ショックにより増加した血漿乳酸値は、HbV分散液で速やかに低下した。HbV分散液は、炎症反応や局所臓器血流低下に伴う低酸素反応を生じないことが明らかとなった。

A. 研究目的

人工酸素運搬体の臨床使用目的の1つには、外傷性大量出血や遠隔地医療、予想外の大量出血における緊急的酸素運搬体の補充がある。これらには、予定手術や侵襲的処置、出血性疾患が含まれる。近年、重症外傷性出血に対する早期大量輸血は、肺換気障害や死亡率の増加が報告されている。好中球や補体などの生体内免疫系の活性化による臓器障害が原因とされている。このためHb小胞体(HbV)分散液による炎症反応への影響を調査することを目的とする。また、以前我々は出血性ショックモデルに対するHbV分散液を用いた輸液蘇生が臓器局所酸素化能を改善することを示した。しかし、臓器全体の酸素化を評価していないため、

臓器内格差については疑問が残る。そこで、臓器全体での低酸素反応も調査することを目的とする。

B. 研究方法

1. 動物の準備

週齢10-13週のS-Dラット（体重 308 ± 43 g）48匹を対象とした。麻酔はsevoflurane 2-4%の吸入麻酔とした。尾静脈から静脈投与用カテーテルを挿入後、1 ml/kg/hの乳酸リンゲル液をベースライン測定まで投与した。開腹後、動脈圧測定と脱血、採血のために総腸骨動脈にカテーテルを挿入した。下大静脈に中心静脈圧測定のためにカテーテルを挿入した。血圧は圧トランスデューサー（日本光電社製、TP-300T）で輸液蘇生後2時間まで行った。