

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

ICU で使用可能な人工赤血球および ME 技術の開発に関する研究

(研究課題番号：H18-創薬-一般-050)

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 純三

(慶應義塾大学 医学部 麻酔科)

平成 20 (2008) 年 4 月

## 別添 2

### 目次

I. 総括研究報告書 .....	1～5
武田 純三（慶應義塾大学医学部 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 武田 純三（慶應義塾大学医学部 教授） .....	6～12
2. 泉 陽太郎（慶應義塾大学医学部 助手） .....	13～16
3. 饗庭 了（慶應義塾大学医学部 講師） .....	17～18
4. 宗 慶太郎（早稲田大学 理総研 助教授） .....	19～22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	23～25
IV. 研究成果の刊行物・別冊 .....	26～

## ICU で使用可能な人工赤血球および ME 技術の開発の関する研究

主任研究者 武田 純三 慶應義塾大学医学部 麻酔科 教授

### 研究要旨

昨年度に引き続き、様々な合併症を有する症例が集まる集中治療室(Intensive Care Unit: ICU)において、人工赤血球、Hb 小胞体の臨床応用を想定した基礎的実験を行なった。期限切れ赤血球より精製した高純度・高濃度ヒトヘモグロビン (Hb) を、リン脂質小胞体に内包した Hb 小胞体 (平均粒径 250nm) の基本物性と製造法に関する基礎技術はほぼ確立されている。さらに、生体に投与した際の安全性に関する研究、および救急医療への応用に関する研究が厚生労働科学研究として行われてきた。製造技術の移転が完了し、GMP 製造、非臨床・臨床試験の準備が進行中である。本研究では昨年度から引き続き ICU 管理と密接な関係にある合併症や管理方法の中から、人工呼吸器管理、出血性ショック、敗血症、膜型人工肺回路による管理における人工赤血球、Hb 小胞体の使用を想定し、個々の課題の側面を反映した動物モデルを用いた検討を行った。また ICU における種々の機器使用、特に回路を介した輸液の投与に際しては人工赤血球の物理化学的安定性が重要な事項となる。赤血球の場合にはいわゆる溶血が問題となり、遊離 Hb が発生した場合には様々な臓器に悪影響を及ぼす可能性があるが、同様の病態の発生を大量投与を前提として開発が進められている Hb 小胞体では回避できるデザインとストラテジーが必要である。また、ICU で高頻度に認められるショック状態では、生体からの活性酸素発生が亢進し酸化ストレスにより脂質膜が障害されるなど、化学的な要因も考慮する必要がある。これらの課題を解決すべく各種刺激に対する溶血率を検討した。

①人工呼吸器管理に伴い人工換気それ自体が肺障害を惹起する可能性が指摘されている (ventilator induced lung injury: VILI)。昨年度に引き続き本研究ではウサギにおける VILI モデルに人工赤血球、Hb 小胞体の投与を行いその肺機能への影響を検討した。生理食塩水分散液では循環動態を維持できない交換率まで人工赤血球使用量を増加させ、5%アルブミン分散液を中心に検討を行った。検討した交換率では Hb 小胞体投与の VILI への悪影響は明らかではなかった。また 5%アルブミン分散液に比べ VILI を軽度軽減する可能性が示唆された。

②ICU 管理を要する症例の多くは様々な疾患あるいは合併症を併発しているが、根本の病態に関わらずある程度共通した症候を示す場合があり、このような観点から提唱された概念の一つとして Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)がある。SIRS は複数の原因による複合的な誘因により全身的に炎症反応が亢進した状態を指す。原因に関らず SIRS には共通の臨床所見と病態があり、対処方法もある程度共通している可能性がある。人工赤血球の臨床応用が想定される出血性ショックは SIRS を惹起する代表的な病因の一つである。本研究では昨年度に引き続き、ラットを用い、SIRS 状態の簡便な評価方法として腸間膜リンパ節の採取および培養方法を検討した。昨年度は出血性ショックと蘇生の条件を変化させ、

血中のサイトカイン測定を行なったが、5%アルブミンによる蘇生によってもかなり安定した循環動態が得られ、腸管からの細菌移行は見られなかった。そこで本研究では若干アプローチを変え、腸管を損傷し、限局性の腹膜炎惹起するモデルを検討した。このモデルでは十分安定してラット腸間膜リンパ節の培養の陽性所見が得られ、軽度の敗血症も誘発している可能性が示唆された。今後本モデルに人工赤血球投与を行うことにより、SIRS 状態における投与を想定したモデルが構築可能と考えられた。

③10kg を下回る新生児や乳児の開心術においては、患児の循環血液量に比較し人工心肺回路の用量が無視できない量となり、過度の血液希釈を回避するためには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。低体重の患者において無輸血充填を行った場合には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。この一方で、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。特に小児においては深刻な問題である。こうした臨床上のジレンマの一解決手段として、我々はヘモグロビン小胞体 (Hb 小胞体) に着目した。本研究では昨年度に引き続きラットを用いた人工心肺モデルを用いて脳機能への影響を検討した。Hb 小胞体充填が脳血流量に及ぼす影響とともに脳組織酸素分圧変化についても基礎的知見を得た。

④ICU における様々な回路を介した使用、ならびに合併症存在下における生体内投与を想定し、本年度は、Hb 小胞体の構造安定度に焦点を当てた検討を行った。赤血球は物理的要因によって溶血することが知られている。人工赤血球が生体内で安定に機能するには、少なくとも赤血球と同等の溶血耐性を有していることが望まれる。また、ICU で高頻度に認められるショック状態では、生体からの活性酸素発生が亢進し酸化ストレスにより脂質膜が障害されるなど、化学的な要因も考慮する必要がある。各種刺激に対する溶血率を指標にした検討の結果、Hb 小胞体が赤血球に比して優れた構造安定性を有していることが示された。

#### 分担研究者

泉 陽太郎 慶應義塾大学医学部 助教  
饗庭 了 慶應義塾大学医学部 講師  
宗 慶太郎 早稲田大学 理工研 准教授

#### A. 研究目的

我々が現在開発を展開している人工赤血球は長期保存が容易であり、いつでもどこでも血液型に関係なく、必要量を安全に供給できることを第一の目標としている。このような人工赤血球の開発は次世代の医療に不可欠であると考えている。この有力な候補の一つとしてリン脂質小胞体(リポソーム)に精製したヒトヘモグロビンを内包した人工赤血球、Hb 小胞体の開発を我々は現在展開している。現在物性規格上最終処方決定、製造技術・工程の確立は厚生科学研究および厚生労働科学研究として進行している。安全性と救急医療への応用も推進されてきた。臨床応用に向けて必要とな

る安全性評価指針および大量製造に関する検討が現在進行中である。昨年度に引き続き本研究では集中治療室という臨床設定における使用を前提とした前臨床実験系を検討してきた。人工赤血球の実際の臨床応用を考えた場合には、手術室における術中の使用とともに集中治療室(Intensive Care Unit: ICU)における使用が多く想定される。ICU においては様々な合併症を併発した状態においての使用が必然的に多くなる。本研究では昨年度に引き続き ICU 管理において遭遇する頻度の高い合併症の中から、人工呼吸器管理、出血性ショック、膜型人工肺回路による管理における人工赤血球: Hb 小胞体の使用を想定し、それぞれ動物モデルを

用いた検討を行った。更に ICU では様々な機器、つまり回路を介しての人工赤血球投与が想定される。また、症例によっては様々な侵襲が加わり、生体反応が活発な状態、種々のサイトカインが豊富に産生されているような環境の中での大量投与が想定される。このような状況で人工赤血球がどれほどの安定性を備えているかを検討することは重要と考え、主として物理化学的負荷をかけた状態での溶血の有無を赤血球との比較も踏まえて検討した。また SIRS 時に産生が想定される活性酸素に対する脂質膜の安定性についても検討した。

## B. 研究方法

A 人工呼吸器管理はそれ自体が肺障害を惹起する可能性が指摘されている (ventilator induced lung injury: VILI)。本研究では昨年度に引き続きウサギの VILI モデルに人工赤血球 Hb 小胞体 (HbV) を投与し、肺障害の程度に影響を与えるか否かを検討した。ICU 管理症例においては循環血液量維持のため膠質を投与する可能性が高く、また交換率をさらに増大させ循環動態を保つためには膠質添加が不可欠であるため、生理食塩水分散液に加え膠質液として 5% アルブミン溶液も分散液として検討した。実験には雄、日本白色家兎 (2.0~2.5 kg) を用いた。全身麻酔下に気管切開を行い、高一回換気量 (30 ml/kg) での人工換気を約 4 時間行った。この換気量において VILI が誘導されることの確認を先ず行った。続いて循環血液量の交換を約 60% へ増量して実験を行った。試料としては生理食塩水並びに 5% アルブミン溶液に分散した HbV と各分散液を比較検討した。

B ICU 管理症例において併発している合併症を包括的に把握する観点から提唱された概念の一つとして Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) のモデル作成について昨年度に引き続き検討した。SIRS は複数の原因により全身的に炎症反応が亢進した状態を指す。原因に関らず SIRS には共通の臨床所見と病態があり、対処方法もある程度共通していると考えられている。本研究では ICU あるいは ICU の周辺において人工赤血球を使用す

る対象として出血性ショックがあり、出血性ショックはまた SIRS 状態を惹起する代表的な原因の一つであることに主眼を置いている。出血性ショックから SIRS 状態への移行する際に腸管の虚血による粘膜バリアの破壊と腸内細菌の移動の可能性が考えられているが昨年度の研究ではラットにおいてそれを再現できなかった。昨年度に引き続き本研究ではラットを用い、SIRS 状態の簡便な評価方法として腸間膜リンパ節の採取および培養方法を検討した。少しアプローチを変更し、腸管に創を作成し限局性の腹膜炎を作成するモデルを検討した。

C 昨年度に引き続き膜型人工心肺回路への Hb 小胞体の応用を検討した。本年度はラットにおけるモデルの安定化に主眼を置いた。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、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った。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した。挿管後人工呼吸器管理とした。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った。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 分間行った。回路内充填量は 60ml とした。本年度は特にラットにおける人工心肺中の脳血流量測定方法を確立した。ドップラー血流計による脳血流量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検討した。またラット側頭部に径約 6mm の穴を作成し、接触型組織酸素分圧測定装置を設置した。

D 洗浄赤血球は新鮮血液を遠心分離して調製した。本研究で使用した Hb 小胞体は、(株)オキシジェニクスにて調製され、諸物性値が確認された状態で研究用試料として提供された。以下の条件で溶

血性試験を実施した。

低張溶血: 洗浄赤血球あるいはHb小胞体分散液を純水で5倍希釈し、浸透圧ショックを与えた。

凍結融解: 洗浄赤血球およびHb小胞体分散液を液体窒素で急速凍結し、室温で放置して融解した。

ホスホリパーゼ A2(PLA2): 洗浄赤血球およびHb小胞体分散液に PLA2 (蛇毒由来) 溶液を添加し37°Cで30分ないし2時間静置した。これらの処理を行った分散液を超遠心分離して、上澄み中のHbをシアノメト Hb 法により定量して溶血率を算出した。

飽和型の DPPC および卵黄ホスホコリン (EYPC) を主成分とする小胞体を調製した (図 1)。脂質組成は DPPC/Cholesterol (5/5, モル比) および EYPC/Cholesterol (5/5, モル比) とした。この粉末を生理食塩水に添加し、1時間水和攪拌した。エクストルージョン (最終フィルター孔径: 0.2 μm) により粒子径を制御し小胞体を得た。

$O_2^{\cdot-}$  はヒポキサンチン(0.5 mM)ーキサンチンオキシダーゼ(25mU/mL)系で発生させた。 $O_2^{\cdot-}$  の定量検出には 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrid[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H) dione sodium salt (L-012)の化学発光を利用した。小胞体 (リン脂質濃度: 5mM) を共存させ、化学発光強度の減少から  $O_2^{\cdot-}$  との反応性を評価した。

### C. 研究結果・考察

A 昨年度の実験と同様に血液ガスデータおよび体血圧は実験中ほぼ安定していた。動脈血酸素分圧は人工呼吸開始後時間経過とともに全群で低下した。生理食塩水群では循環動態が維持できず実験の完遂は不可能であった。5%アルブミン溶液群では時間経過とともに低下がみられた。これに対して5%アルブミン溶液分散 HbV 群ではほぼ一定に保たれた。切除肺においては両群で肺水腫が見られたが明らかな差は見られなかった。さらなる組織学的検討を要する。さらなる検討が必要であるが、5%アルブミン溶液分散においては Hb 小胞体の投与が VILI を若干軽減する可能性が示唆された。換気量をさらに増加させた検討も必要と考えられた。

B 昨年度と同じく無処置のラットにおいては上腸管膜動静脈周囲の脂肪組織中に肉眼的に微小なリンパ節が少数確認できたのみであった。病理組織学的にはこれらがリンパ節であることが確認できたが、培養による陽性所見は得られなかった。腸管損傷モデルとしては盲腸の回盲部より末梢を結紮後同部を18G針で穿刺し、閉腹した。4~7日目に開腹を行った。腹腔内には軽度から中等度の腹水が見られ、限局性の腹膜炎が見られた。腸管膜脂肪組織中のリンパ節には腫大が見られた。病理組織学的にはリンパ節が確認された。培養結果は好気性培養が陽性であった。嫌気性培養は陰性であった。血液培養も少数ではあったが培養陽性所見が得られた。本モデルにより SIRS 状態における人工赤血球投与の影響に関する予備的知見が得られる可能性が示唆された。

C 昨年度に引き続きラット人工心肺回路の装着技術の確立を得た。アルブミン充填群において人工心肺運転中のヘマトクリット値は20%を保つことが可能になった。人工心肺運転中の全身的な酸素化は良好であった。人工心肺中の脳毛血流量を安定して測定することができた。脳組織酸素分圧変化についても基礎的知見が得られた。

D 低張溶血により  $94.0 \pm 0.7\%$  の Hb が赤血球から漏出したが、Hb 小胞体では同条件の浸透圧変化にてわずかに  $0.4 \pm 0.0\%$  の Hb が溶出するに留まった。正常な赤血球では0.5%生理食塩水で溶血を開始し、0.35%で完全に溶血することが知られている。本実験では0.18%の低張液にて高い浸透圧ショックを与えているにも関わらず Hb 小胞体の内包構造は保持されることから、晶質浸透圧変化に対して Hb 小胞体が高い耐性を有していることがわかる。

凍結融解では氷の結晶化の進行により膜構造が断片化する。凍結融解では赤血球と Hb 小胞体の両方で Hb の漏出を認め、凍結保護剤なしでの Hb 小胞体の凍結は禁忌事項として挙げられる。

また、ホスホリパーゼ A2 (PLA2)を共存させる

と、赤血球では経時的に溶血が進行するのに対し、Hb小胞体では2時間後まで殆ど溶血を認めなかった。

以上の結果は、通常赤血球が安定に循環できる環境では、Hb小胞体は十分な構造安定性を有していることを示している。

天然リン脂質はグリセロールの2位炭素に不飽和脂肪酸を有している。特に酸化されやすいのはリノール基やリノレン基などの多価不飽和脂肪酸であり、アリル位の電子状態が不安定なことに由来する。一定量の $O_2^{\cdot-}$ 発生系でDPPC小胞体あるいはEYPC小胞体を共存させると、EYPC小胞体系で検出される $O_2^{\cdot-}$ はDPPC小胞体系に比較して85%であり、EYPCはDPPC比較して $O_2^{\cdot-}$ と高い反応性を有していることを示している。Hb小胞体の脂質二層膜成分は生体膜に比して活性酸素との反応性に乏しいため、酸化的雰囲気においてもHb

小胞体膜の構造と機能は比較的安定に保持されることが考えられる。

#### D. 結論

昨年度に引き続きICUという特殊な環境における人工赤血球使用に関する複数の重要な知見が得られた。本研究ではICUにおいて想定される病態および疾患管理方法として人工呼吸器管理下における肺への影響、敗血症、種々の物理化学的刺激に対する安定性、人工心肺回路を検討した。さらなる検討が必要であるが、いずれの使用状況においても人工赤血球、Hb小胞体の有用性が示唆された。またICU管理における病態に対応する小胞体の修飾、膜構成成分の改良についても可能性が示唆された。次年度のさらなる研究の進展が期待される

別添 4-1

平成 19 年度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）  
分担研究報告書

ICU で使用可能な人工赤血球および ME 技術の開発に関する研究

分担課題： ICU における呼吸障害の分析と人工赤血球利用法の開発

主任研究者	武田 純三	慶應義塾大学医学部	麻酔科	教授
研究協力者	長田 大雅	慶應義塾大学医学部	麻酔科	助教
	山田 高成	慶應義塾大学医学部	麻酔科	助教
	森崎 浩	慶應義塾大学医学部	麻酔科	准教授

研究要旨

集中管理室（ICU）においては肺障害の発生を前提に治療が必要となる症例が多く、またすでに人工呼吸器管理が行われている場合も多い。本研究では昨年度に引き続き、人工赤血球の投与が人工呼吸器管理下にある肺に及ぼす影響について検討した。人工呼吸器管理はそれ自体が肺障害を惹起する可能性が指摘されている（ventilator induced lung injury: VILI）。本研究ではウサギの VILI モデルに人工赤血球 Hb 小胞体（HbV）を 5%アルブミン分散液として投与し、肺障害の程度を検討した。投与交換率を上昇させると HbV 群における VILI の度合いは 5%アルブミン投与と比較して軽度である可能性が示唆された。

A. 研究目的

集中管理室(Intensive Care Unit: ICU)における治療対象症例の多くは肺に何らかの障害がみられる。この場合には呼吸機能を補助する必要がある、その代表的なものが人工呼吸器を用いた呼吸管理である。人工呼吸器は換気量、換気回数、酸素濃度などが設定可能であり、障害肺の機能を極めて効果的に補助する。ただし換気方法は生理的な呼吸とは異なり陽圧換気となる。このため肺胞は非生理的な過進展を受ける。近年、この機械的刺激が肺胞および肺毛細血管領域で炎症反応を惹起し、肺胞-肺毛細血管バリアを障害し、ガス交換を障害する可能性（ventilator induced lung injury: VILI）が指摘されている。詳細な機序は未だに明らかではないが、人工呼吸器管理そのものが肺に及ぼす障害について我々は従来から様々な検討を行ってきた。その中で血液中の白血球や血管内皮における接着因子および様々なサイトカインの関与が明らかになってきている。これらの知見は人工呼吸器管理が肺に及ぼす影響は全身状態と密接に関連

していることを示唆している。一方、様々な動物実験において人工赤血球投与の安全性が確認されているが、ICU における投与を想定した場合には、人工呼吸器管理施行中の投与が行われる状況を考えざるを得ない。本研究では昨年度に引き続き、人工呼吸器管理下に人工赤血球を投与した際の肺機能への影響を検討した。特に人工赤血球投与が VILI を増悪させる可能性があるか否かを中心に検討した。ICU における投与においては人工赤血球に膠質液を添付して使用する可能性が高いと考えられる。VILI における肺血管透過性の変化の可能性を考えると、膠質液に分散させた人工赤血球は、生理食塩水などの晶質液に比べて異なった影響を VILI に与えることも考えられた。このため 5%アルブミン液に分散させた試料を中心に検討し、かつ投与量（交換率）を増加させて検討した。

B. 研究方法

動物種：雄、日本白色家兎（2.0～2.5 kg）。

実験操作：麻酔導入薬としてケタミン 100 mg を



筋注。鎮静が得られた後耳静脈を確保した。耳静脈より鎮静薬 0.5 % ペントバルビタール 4 ml/kg/hr の投与を開始した。頸部に枕木をあて、仰向けに固定した。頸部および胸部腹側を剃毛した後消毒を行った。頸部に局所麻酔薬 0.5 % リドカイン 3 ml を皮下投与した。頸部に皮切を加え気管切開を施行し、気管周囲を剥離した。気管近傍の内頸動脈を露出し、内頸動脈ラインを確保した。内頸動脈ラインより持続的に動脈圧を測定し、また動脈血採血用ラインとして用いた。循環動態が安定した後、ほぼ通常の換気量（本実験では低一回換気量と定義する、8 ml/kg）にて人工換気を開始した。換気と呼吸状態が安定した後、筋弛緩薬バンクロニウム 1 mg 静脈投与を行った。その後は筋弛緩を得るため、0.3 mg/kg/hr にてバンクロニウムを経静脈持続投与した。血圧、脈拍、呼吸状態が安定した後ベースラインの動脈血液ガス分析とヘマトクリット測定を行った。その後動脈ラインより脱血、静脈ラインより試料の投与を行い（約 10ml/min）、循環血液量の約 60 % を試料で置換した。この交換スピードでは交換中の循環動態に明らかな変化は見られなかった。なお循環血液量は従来の検討より 56ml/kg とした。交換終了後再び動脈血液ガス分析およびヘマトクリット値の測定を行った。測定終了後一回換気量を増加させ、高一回換気量 (30 ml/kg) での人工換気を開始した。高一回換気開始後 30 分、120 分、180 分、240 分後に、動脈血液ガス分析を行った。この間の人工呼吸器の設定は、換気回数を 20 回/分とし、動脈血  $pCO_2$  が 35~45 mmHg となるように適宜回路内に死腔を挿入した。高一回換気量による人工呼吸開始 240 分後に、最終動脈血液ガス分析を行った後、5 % ペントバルビタール 4 ml を投与して犠牲死させた。両側肺を摘出後、右主気管支を閉鎖し、右肺を切離した。気管より約 20cm 水柱にて 10% 緩衝ホルマリンを注入し、左肺を充填した。左肺は病理組織標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。右肺は湿乾重量比の測定に用いた。試料としては人工酸素運搬体 Hb 小胞体 5% アルブミン分散液 (HbValb) と 5% アルブミン (alb) を用いた。各群間の比較を行った。データは平均値±標準偏差で

表した。昨年度に引き続き本研究で使用した Hb 小胞体は、(株)オキシジェニクスにて調製、物性値評価され研究用試料として配布された。

### C. 研究結果・考察

生理食塩水群では 60% 交換では実験期間中の生存が維持できなかった。このため 5% アルブミンを含む群のみの検討となった。ヘマトクリットは HbValb 群では交換前  $39 \pm 2\%$  から交換後  $26 \pm 1\%$ 、alb 群では交換前  $39 \pm 1\%$  から交換後  $16 \pm 2\%$ 、へ低下した (図 1)。両群間に有意差は無く、両群ともに循環血液量のほぼ 60% が実際に交換されたと考えられた。膠質である 5% アルブミンを含む試料ではより循環血液量が保たれるためか、交換後のヘマトクリットはやや低めであった。

平均体血圧は時間とともに序々にやや低下する傾向がみられたが有意な低下ではなかった (preex: 脱血交換前、postex: 脱血交換後)。また群間に明らかな差は見られなかった (図 2)。生理食塩水に分散した試料では、血液希釈が起こり、その結果循環血液量が若干低下するため、血圧の低下につながったと考えられたが、この傾向は 5% アルブミンに分散した際には軽減されると考えられ、今回の実験においても 5% アルブミンに分散したためか交換率を 60% に増加したにもかかわらずやや高値を保った。動脈血酸素分圧は時間経過とともに両群で低下傾向が見られた。(preex: 脱血交換前、postex: 脱血交換後)。HbValb 群では低下が緩やかである可能性が考えられた。分散液として 5% アルブミンを用いた場合には生理食塩水を分散液とした場合に比べ動脈血酸素分圧が低く推移する可能性が考えられ、実際に alb 群ではそのような傾向が見られた (図 3)。

肺への水分貯留量、すなわち肺水腫/肺障害を反映する指標となる湿乾重量比は alb 群に比べて HbV を含んだ試料で低く抑えられる可能性が考えられた (図 4)。

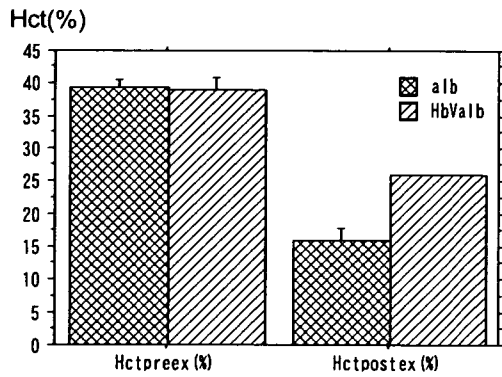


図1 Hct(%)

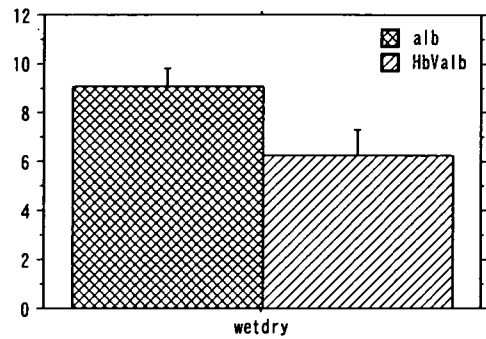


図4 湿乾重量比

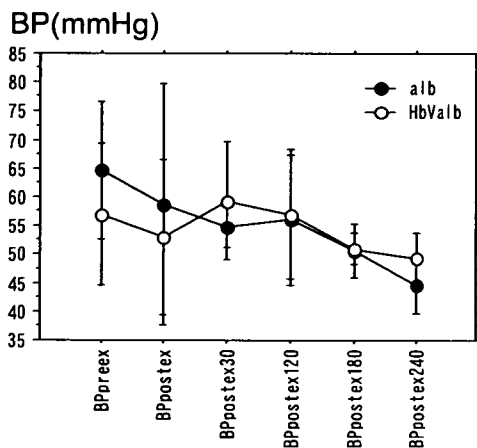


図2 BP(mmHg)

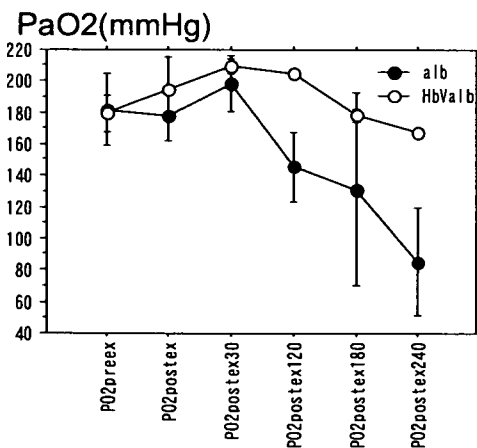


図3 PaO<sub>2</sub>(mmHg)

昨年度生理食塩水分散群と 5%アルブミン溶液分散群で有意な差は見られなかった点を考慮すると、交換率の上昇により肺障害の程度に何らかの差が発生している可能性もある。切除肺においては両群で肺水腫が見られた。また、両群で軽度のうっ血が見られた。好中球浸潤などの炎症所見は明らかではなかった。VILI の発生原因については近年様々な知見が蓄積されつつあるが、未だ明らかではない部分も多い。陽圧換気による肺の非生理的進展がきっかけになり、その後肺毛細血管内皮細胞や白血球の活性化を介して、様々なサイトカインの関与が考えられている。このため VILI の病態は全身状態と密接に関連すると思われる。また、我々の今までの検討では、全身的に他の何らかの侵襲が加わった場合に VILI が顕在化する可能性も考慮する必要がある。これらの意味で、人工呼吸器管理の行われる頻度が高い ICU において人工赤血球を投与する場合には、VILI あるいはそれに類似した状況を想定する必要があると考えられる。本実験では昨年度に引き続き基礎的検討として兎における VILI のモデルを用い、人工赤血球、Hb 小胞体を投与した際の影響を検討した。投与方法は交換輸血とし、交換率を 30%から 60%に増量した。生理食塩水群ではこの交換率での生存は得られなかった。おそらく膠質浸透圧低下により有効循環血液量が維持できなくなってしまうためと考えられた。このため 5%アルブミン溶液投与ならびに Hb 小胞体を 5%アルブミン溶液に分散した試

料との比較を行った。さらなる検討が必要であるが、HbV 投与が VILI に影響を及ぼしていると考えられるような所見は今回の検討では得られなかった。また、VILI によりもし肺毛細血管透過性が高まるのであれば、それに伴う肺水腫や肺障害は 5% アルブミン投与群においてより顕在化する可能性が考えられた。今回の検討では昨年度の生理食塩水群に比べると 5% アルブミン溶液群では若干動脈血酸素分圧が低下する可能性が考えられた。これに対し 5% アルブミン溶液分散 HbV 群では動脈血酸素分圧はほぼ維持される結果となった。

#### D. 結論

人工赤血球を ICU で使用する場合、高頻度に合併、遭遇する可能性がある VILI を動物モデルで再現し、人工赤血球投与の影響を検討した。本研究で設定した VILI のレベルでは、人工赤血球投与による VILI の修飾は明らかではなかった。また分散液として生理食塩水と 5% アルブミン溶液を検討したが、交換率を 60% とすると HbV により VILI のレベルが軽減される可能性が示唆された。臨床では VILI のレベルは多岐にわたると考えられ、今後 VILI の程度を変化させてさらなる検討が必要と考えられた。

#### E. 研究業績

##### 1. 論文発表

1. Serita R, Morisaki H, Tanaka C, Kosugi S, Sakuraba S, Takeda J. Effects of magnesium sulfate on neuromuscular function and spontaneous breathing during sevoflurane and spinal anesthesia. *J Anesth* 21:86-89,2007.
2. Kashimoto S, Seki N, Ishiguro T, Yoshioka H, Nagata O, Nishimura K, Kikuchi T, Yamada T, Iwade M, Omi A, Honda O, Sakamoto A, Ogihara Y, Fujimoto K, Nakaigawa Y, Kato J, Watanabe A, Nomura M, Takeda J. Nicorandil decreases cardiac events during and after noncardiac surgery. *J Clin Anesth* 19:44-48, 2007.
3. Yamada T, Katori N, Tanaka K, Takeda J. Impact of Sonoclot hemostasis analysis after cardiopulmonary

bypass on postoperative hemorrhage in cardiac surgery. *J Anesth* 21:148-152, 2007.

4. Nakamura N, Morisaki H, Suzuki T, Yajima S, Katori N, Kotake Y, Funakoshi Y, Kawabata K, Yamada S, Ishizaka A, Takeda J. Inhibition of neutrophil elastase attenuates gut mucosal injury evoked by acute alveolar hypoxia in rabbits. *Shock* 28(1):101-105,2007.
  5. 小竹良文、武田純三. 新しい非脱分極性神経筋遮断薬ロクロニウム(Org9426)の紹介. *臨床麻酔* 31 (4) : 677-692, 2007.
  6. 小谷聡秀、森山 潔、山田達也、森崎 浩、武田純三. 冠攣縮性狭心症を合併した QT 円腸症候群患者の麻酔経験. *臨床麻酔* 31 (5) : 905-906, 2007.
  7. 武田純三: 特集「手術室における薬剤業務の推進」 麻酔科医からの期待. *月刊 薬事* 49 (7) : 963-966, 2007.
  8. 小竹良文、鈴木武志、長田大雅、山田高成、武田純三. プロポフォルとデクスメトミジン併用による鎮静と血中濃度のシミュレーションに関する検討. *日臨麻会誌* 27 (4) : 351-357, 2007.
  9. 栗林淳也、山田達也、森崎浩、武田純三. Mulvihill-Smith 症候群の麻酔経験. *麻酔* 56(7) : 835-837, 2007.
  10. 武田純三. 麻酔の質の向上を目指して—特集に当たって. *Pharma Medica* 25(8):7-8, 2007.
  11. 橋口さおり、武田純三. Patient Controlled Analgesia(PCA: 患者自己管理鎮痛法). *Pharma Medica* 25(8):35-38, 2007.
- ##### 2. 学会発表
1. Seino Y, Nomura M, Ozaki M, Uezono S, Inada E, Takeda J, Kazama T, Sakamoto A, Ochiai R, Suzuki T / Cardiac output determination from arterial pressure waveform analysis showed a good estimation compared with thermodilution method derived with pulmonary artery catheter / SCA 29<sup>th</sup> Annual Meeting & Workshops / April, 2007 / Montreal
  2. Kuribayashi J, Kuwana S, Sakuraba S, Hosokawa Y, Takeda J / Neural Mechanisms of

- Sevoflurane-Induced Central Respiratory Depression in Neonatal Rats / 2007 ASA Annual Meeting / Oct, 2007 / San Francisco
3. Kotake Y, Yamada T, Nagata H, Suzuki T, Takeda J / Mixed Venous Hemoglobin Saturation Estimation with Cardiac Output and CO<sub>2</sub> Production / 2007 ASA Annual Meeting / Oct, 2007 / San Francisco
  4. Yamada T, Nagata H, Yajima S, Kotake Y, Takeda J / The Influence of Cannulation Site on the Accuracy of Arterial Pressure-Based Cardiac Output (APCO) / 2007 ASA Annual Meeting / Oct, 2007 / San Francisco
  5. Nagata H, Yamada T, Kotake Y, Takeda J, Naoki Kobayashi N / Continuous Measurement of O<sub>2</sub> Delivery and Uptake with PA Catheter and Pulse Total-Hemoglobinometer / 2007 ASA Annual Meeting / Oct, 2007 / San Francisco
  6. Yajima S, Morisaki H, Yamada T, Takeda J / Normoglycemia Rather Than Insulin Levels Minimizes Gut Barrier Dysfunction in Endotoxemic Rats / 2007 ASA Annual Meeting / Oct, 2007 / San Francisco
  7. Morisaki H, Yajima S, Watanabe Y, Katori N, Takeda J / Hypercapnic Acidosis Protects Gut Barrier Function Possibly through Non-Inflammatory Mechanisms / 2007 ASA Annual Meeting / Oct, 2007 / San Francisco
  8. 小竹良文、長田大雅、山田高成、桜庭茂樹、鈴木武志、香取信之、芹田良平、森崎 浩、武田純三 / プロポフォルとデキスメドミジン併用による心臓大血管術後患者の鎮静 / 第34回日本集中治療医学会学術集会 / 2007年3月 / 神戸
  9. 小竹良文、鈴木武志、香取信之、芹田良平、武田純三、小林直樹、武田朴 / 肺動脈カテーテルと経皮的ヘモグロビン測定装置を用いた連続的酸素供給量および消費量評価の試み / 第34回日本集中治療医学会学術集会 / 2007年3月 / 神戸
  10. 中村弘美、武田純三、小竹良文、芹田良平、安藤朋子、大橋敬子 / より安全に、よりスムーズに -カテコラミン持続投与における新たなし臨時交換方法の検討- / 第34回日本集中治療医学会学術集会 / 2007年3月 / 神戸
  11. 亀迫純也、久保さと子、安藤朋子、小竹良文、武田純三 / CAP-2410 (集中治療部支援システム) 導入への取り組みと今後の課題 第2報 / 第34回日本集中治療医学会学術集会 / 2007年3月 / 神戸
  12. 関博志、森山潔、白石良樹、福永興一、石坂彰敏、武田純三 / マウス塩酸肺障害モデルに対する Y40138 の効果の検討 / 日本麻酔科学会第54回学術集会 / 2007年5月 / 札幌
  13. 芹田良平、小竹良文、森崎浩、武田純三 / 敗血症ラットにおけるニカラベンの心機能およびサイトカイン産生に及ぼす影響 / 日本麻酔科学会第54回学術集会 / 2007年5月 / 札幌
  14. 西部伸一、細川幸希、濱田佑子、武田純三、藤本隆夫、諏訪智英 / 小児麻酔時の気管支鏡による声門部の観察 -Soft Seal LMA と Classic LMA の比較- / 日本麻酔科学会第54回学術集会 / 2007年5月 / 札幌
  15. 上田朝美、森山潔、逢坂佳宗、杉志都子、武田純三 / 帝王切開術後の経静脈的鎮痛及び硬膜外鎮痛の有用性 -当院における112例の検討 / 日本麻酔科学会第54回学術集会 / 2007年5月 / 札幌
  16. 桜庭茂樹、山田達也、長田大雅、武田純三 / 経食道心エコーが有用であった左室瘤破裂緊急症例 / 日本麻酔科学会第54回学術集会 / 2007年5月 / 札幌
  17. 佐伯陽子、山田高成、森山潔、藍公明、小竹良文、武田純三 / 手術室外で発見された硬膜外カテーテルのくも膜下腔迷入 / 日本麻酔科学会第54回学術集会 / 2007年5月 / 札幌
  18. 小竹良文、山田高成、長田大雅、武田純三 / エチルピルビン酸加リンゲル液投与による腹部臓器の虚血-再灌流障害に対する保護効果 / 日本麻酔科学会第54回学術集会 / 2007年5月 / 札幌
  19. 細川幸希、桑名俊一、桜庭茂樹、栗林淳也、辻田美紀、武田純三 / ラウダノシンの中枢性呼吸調節機構へ及ぼす影響 -新生ラット摘出脳幹脊髄標本を用いた基礎的検討 / 日本麻酔科学会第54回学術集会 / 2007年5月 / 札幌
  20. 西脇千恵美、小杉志都子、大西幸、橋口さおり、津崎晃一、武田純三 / 硬膜外カテーテル抜去後

- に生じた急性硬膜外血腫／日本ペインクリニック学会  
第41回大会／2007年7月／横浜
21. 小杉志都子、西脇千恵美、大西幸、橋口さおり、津崎晃一、武田純三／癌性疼痛に対するガバペンチンの有効／日本ペインクリニック学会第41回大会／2007年7月／横浜
  22. 御園生与志、森山 潔、山田達也、武田純三／拡張型心筋症及び慢性腎不全合併患者に対する腹部大動脈瘤手術／第16回日本集中治療医学会関東甲信越地方会／2007年8月／横浜
  23. 山田高成、長田大雅、矢島聡、羽鳥英樹、鈴木武志、香取信之、芹田良平、小竹良文、武田純三／術中大量出血後の遷延性出血に対し明らかな線溶亢進の所見を欠くにもかかわらずトラネキム酸が奏功したと思われる1例／第16回日本集中治療医学会関東甲信越地方会／2007年8月／横浜
  24. 羽鳥英樹、鈴木武志、芹田良平、山田高成、桜庭茂樹、加藤純悟、小竹良文、武田純三／食道癌術後に横隔膜ヘルニアを発症した1例／第16回日本集中治療医学会関東甲信越地方会／2007年8月／横浜
  25. 井上 敬、吉川 ひろか、岩室 賢治、山田 達也、香取 信之、武田 純三／側彎症と左上大静脈遺残を合併した心房中隔欠損症に対するPort-Access法の一例／日本心臓血管麻酔学会第12回大会／2007年9月／福岡
  26. 山田 達也、加藤 純吾、香取 信之、武田 純三／経食道心エコーが有用であった左室内腫瘍の麻酔経験／日本心臓血管麻酔学会第12回大会／2007年9月／福岡
  27. 永渕万理、逢坂佳宗、森山潔、武田純三／レミフェンタニルを用いて自発呼吸下にダブルルーメンチューブを気管挿管した一例／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  28. 井上 敬、森山 潔、香取 信之、武田純三／慢性呼吸不全患者に対する覚醒下胸腔鏡下ブラ切除術において、レミフェンタニル投与による呼吸数の調整が有用であった一例／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  29. 岩室賢治、安藤嘉門、山田達也、武田純三／レミフェンタニルを用いて意識下ファイバー挿管を行ったNoonan症候群の一例／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  30. 西島亜弥、濱田佑子、森山 潔、武田純三／再発を繰り返す頸部気管乳頭腫に対する切除術の麻酔管理／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  31. 御園生与志、森山潔、山田達也、中塚逸央、武田純三／32FrのBlueLine気管支内チューブTMによる経鼻挿管／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  32. 濱田佑子、森山 潔、細川幸希、小竹良文、武田純三／術後に著明な舌腫脹を認め長期人工呼吸管理を要した脊髄髄内腫瘍摘出術の1例／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  33. 安藤嘉門、山田達也、逢坂佳宗、武田純三／分離肺換気を必要とした上行大動脈仮性動脈瘤の麻酔経験／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  34. 五十嵐達、長田大雅、森山 潔、武田純三／食道癌術後胃気管支瘻患者に対する気管切開・ステント挿入術の麻酔経験／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  35. 豊永晋也、長田大雅、森山潔、武田純三／抗血小板薬及び抗凝固薬内服患者に対する腹部大動脈瘤手術での硬膜外麻酔の適応／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  36. 鈴木 潤、中塚逸央、武田純三／帝王切開術中に呼吸音とSpO<sub>2</sub>低下を認め、リトドリン肺水腫と考えられた1例／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
  37. 吉川ひろか、西脇千恵美、長田大雅、森山 潔、橋口さおり、武田純三／デクスメトミジンを使用し周術期管理した鬱病合併妊娠患者に対する帝王切開術の一例／日本麻酔科学会 東京・

関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮

38. 高木美沙、山田達也、森山 潔、武田純三／術中に off pump から on pump beating へ移行した冠動脈仮性動脈瘤を合併した症例の冠動脈バイパス術の麻酔経験／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
39. 菅沼紘平、矢島聡、森山潔、橋口さおり、武田純三／超肥満患者の全身麻酔管理にデクスメデトミジンによる鎮静が非常に有効であった1症例／日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
40. 坂口了太、逢坂佳宗、牧戸香詠子、森山潔、武田純三／低濃度の硬膜外ロピバカインとレミフェンタニルの持続投与により術中管理した腹腔鏡下褐色細胞腫摘出術の麻酔経験／日本麻酔科

学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮

41. 佐伯陽子、山田高成、森山潔、小竹良文、武田純三／低心機能患者に対する生体腎移植術の周術期管理, 日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第47回合同学術集会／2007年9月／宇都宮
42. 鈴木 潤、中塚逸央、武田純三／デクスメデトミジンの使用により肺高血圧クリーゼの再発が予防できた小児症例／日本小児麻酔学会第13回大会／2007年11月／那覇
43. 木下智恵、渡邊陽子、中塚逸央、武田純三／反復する気胸に対し自発呼吸を温存し Fogarty カテーテルを用いて分離肺換気を行った1症例／日本小児麻酔学会第13回大会／2007年11月／那覇

ICU で使用可能な人工赤血球および ME 技術の開発の関する研究

分担課題： SIRS 状態に於ける人工赤血球の機能解析

分担研究者 泉 陽太郎 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助教

研究要旨

集中治療室（ICU）管理を要する症例の多くにおいて様々な原因により全身性に炎症反応が亢進した状態（Systemic Inflammatory Response Syndrome：SIRS）が見られる。人工赤血球は赤血球輸血の代替として開発が進められているが、人工赤血球投与の必要性が予測される出血性ショックにおいては、ほぼ全例に SIRS 状態が見られる、あるいは潜在している可能性が考えられる。このような状態において人工赤血球の投与を行った場合には正常な状態とは異なる影響が見られる可能性がある。昨年度に引き続き本研究では SIRS 状態を再現するラットモデル作成を試みた。出血性ショックにおいて腸間膜リンパ節への腸内細菌の移行が報告されており、SIRS 状態の指標の一つになり得ると考えられる。昨年度本研究では人工赤血球を用いた出血性ショック蘇生において条件を変化させて腸管膜リンパ節の培養を行った。また、いくつかの条件において血中の複数のサイトカインを測定した。しかし昨年度本研究の条件設定では腸管膜リンパ節培養で細菌は検出されず、培養方法の再検討および出血性ショック状態をさらに遷延させる必要があると考えられた。血中のサイトカインについては因子により増加時期が異なるため、異なった検出時期が必要と考えられた。これらの結果を踏まえて、本年度は SIRS 状態を再現するラットモデルとして腸管損傷モデルを検討した。盲腸穿孔あるいは盲腸結紮後穿孔モデルでは限局性の腹膜炎が発生し、腸間膜リンパ節腫大が高率に見られた。またリンパ節培養にて大腸菌、腸球菌、B 溶連菌が高率に検出された。人工赤血球投与による SIRS 状態の変化を検討する有用なモデルになり得ると考えられた。

A. 研究目的

ICU 管理を要する症例の原疾患は多岐にわたる。また、これらの症例では原疾患に加え様々な疾患あるいは合併症を併発している。このため、個々の原因疾患に関わらず各時点における全身状態を包括的に把握する必要がある。このような観点から提唱された概念の一つとして Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)がある。SIRS は複数の原因により全身的に炎症反応が亢進した状態を指す。概ねその原因に関らず SIRS には共通の臨床所見と病態があり、対処方法も共通している部分が多い。ICU あるいは ICU の周辺にお

いて人工赤血球を使用する対象として出血性ショックがある。出血性ショックは様々な疾患に顕在あるいは潜在的に関与する。出血性ショックはまた SIRS 状態を惹起する代表的な原因の一つでもある。出血性ショックから SIRS 状態への移行原因の一つとして腸管の虚血による粘膜バリアの破壊と腸内細菌の移動の可能性が考えられている。この際の人工赤血球投与の影響について、我々は以前出血性ショック時の腸管虚血が人工赤血球、Hb 小胞体投与により軽減される興味深い知見を得ている（Yoshizu et al., ASAIO J 2004;50:458-463）。また同じモデルにおいて出血ショック時に血中の TNF

$\alpha$ が上昇することが確認されており、この上昇はHb小胞体投与により有意に抑制された。本研究では同様なモデルを用いてTNF $\alpha$ を含む複数のサイトカインの推移を確認することを目指した。昨年度本研究では先ず出血性ショック時のSIRS状態のより簡便かつ早期に行える評価法として、腸管リンパ節の培養を試みたが、出血性ショック単独では培養陽性所見は得られなかった。この結果を踏まえて、本年度はアプローチを変更し腸管の損傷モデルを検討した。

## B. 研究方法

動物種：ラット、雄、約250g。

実験方法：ラットにケタミンとキシラジンの混合液を筋注(10mg/kg)し麻酔を行った。腹部を剃毛後70%アルコールで消毒を行った。腹部正中切開を行い、小腸をたどり、上腸間膜動静脈を確認する。上腸管膜リンパ節はその近傍の脂肪組織中に存在する。

実験①上腸間膜動静脈近傍の脂肪組織を採取し、病理組織学的検査を行った。

実験②腹部正中切開を行い、盲腸の表面に18G針で穿刺創を作成し閉腹した。ラットは生存させ、体重、活動度などを観察した。4～7日後に再度開腹し腹腔内を観察した。また、上腸間膜動静脈近傍の脂肪組織を採取し病理組織学的検査と嫌気性および好気性培養検査を行った。対象として開腹を行った後その他の処置は行わず閉腹した群も検討した。

実験③麻酔下にラットの大腿動脈にカテーテルを留置した。ここから推定循環血液量(56ml/kg)の50%に相当する血液を約5分間かけて脱血し出血性ショック状態とした。この状態を約15～30分間維持した。その後大腿動脈カテーテルより試料を投与した。その後1、2日目に採血を行い、遠心分離を行った後血漿を-80℃に保存した。ELISA法にて複数のサイトカインの測定を行った。

実験④腹部正中切開を行い、盲腸を回盲部より末梢で結紮後18G針で穿刺し、閉腹した。ラットは生存させ、体重、活動度などを観察した。4～7日後に再度開腹し腹腔内を観察した。また、上腸間

膜動静脈近傍の脂肪組織を採取し病理組織学的検査と嫌気性および好気性培養検査を行った。対象として開腹を行った後その他の処置は行わず閉腹した群も検討した。

本研究で使用したHb小胞体は、(株)オキシジェニクスにて調製、物性値評価され研究用試料として配布された。

## C. 研究結果・考察

実験①無処置のラットにおいて上腸管膜動静脈周囲の脂肪組織中には少量のリンパ節が存在すると考えられた。肉眼的には脂肪組織中に微小なリンパ節が少数確認できた。病理組織学的にもこれらがリンパ節であることが確認できた。

実験②ラットの活動性に著変は見られなかった。体重は一過性に減少したが、速やかに回復した。盲腸の穿刺創の修復4～7日後に開腹を行った。盲腸漿膜表面には微小な出血斑が見られた。創部周囲には軽度の腹膜炎が発生しており、癒着が見られた。腹腔内に腹水が少量存在した。開腹部にも軽度の癒着が見られた。上腸管膜動静脈周囲の脂肪組織中に肉眼的に見られたリンパ節は実験①の無処置群に比べより顕著であり、リンパ節腫大が見られた。培養結果は好気性培養、嫌気性培養ともに陰性であった。開腹した後無処置で閉腹を行った群ではリンパ節腫大は顕著ではなかった。

実験③ショック蘇生後ラットの活動性、食欲には変化は見られなかった。またアルブミン群、HbV群で差は見られなかった。体重もアルブミン群、HbV群で差は見られなかった。ショック蘇生後4、7日目に開腹を行った。腹腔内に明らかな異常所見は見られなかった。4日目には上腸管膜動静脈周囲の脂肪組織中のリンパ節は無処置群と同様明らかではなかった。7日目には上腸管膜動静脈周囲の脂肪組織中のリンパ節は肉眼的にはより明らかであった。病理組織学的にはリンパ節が確認されたが、4、7日目ともに培養結果は好気性培養および嫌気性培養ともに陰性であった。

実験④ラットの活動性は術後2日目あたりまで若干低下したがその後回復した。体重は一過性に減少したが、速やかに回復した。盲腸の結紮後穿刺



創作成後4～7日後に開腹を行った。創部周囲には限局した腹膜炎が発生しており、癒着が見られた。腹腔内に腹水が存在した。開腹部にも軽度の癒着が見られた。上腸管膜動静脈周囲の脂肪組織中に肉眼的に見られたリンパ節は実験①の無処置群に比べより顕著であり、リンパ節腫大が見られた。培養結果は好気性培養にて大腸菌、腸球菌、B群溶連菌が高率に検出された。嫌気性培養は陰性であった。1例で血液中からも腸球菌が検出された。

代表的炎症性サイトカインとしてTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10を測定した。TNF $\alpha$ の上昇が一部の動物で示唆された。炎症に抑制的に作用すると考えられているIL-10においては明らかな変化は見られなかった。

昨年度に引き続き出血性ショックからSIRS状態への移行原因の一つとされている腸管の虚血による粘膜バリアの破壊と腸内細菌の移動の可能性を再現し評価し得る動物モデルの作成を試みた。それと平行して血中サイトカインの推移も測定した。昨年度の検討では腸管膜リンパ節は開腹のみでは影響は受けにくいと考えられた。従来報告では、ラットを用いたエンドトキシン投与モデルや出血性ショックモデル、および腸管結紮や腸管虚血再還流モデルにおいて腸間膜リンパ節の細菌培養の陽性化が報告されている。これらの病態において全身的にサイトカインの産生が亢進するとされている。昨年度は腸管膜に損傷を作成し、その修復を行なった。このモデルでは腸管漿膜の擦過のみの比べて侵襲は増大したと考えられたが、検討した範囲では腸間膜リンパ節の培養陽性所見は得られなかった。さらに培養方法などを見直すことも必要と考えられたが、侵襲と採取時期をさらに検討する必要があると考えられた。血中のサイトカインの推移についても一定の傾向は見られず、ある程度候補を絞った上で、時間軸を広げて測定する必要があると考えられた。本年度行った盲腸結紮後穿孔モデルでは、限局性腹膜炎が見られ、また腸間膜リンパ節の腫大、好気性菌培養陽性所見が得られた。出血性ショックモデルにおいては膠質液による出血性ショック蘇生はそれ自体有効である可能性があり、さらにヘマトクリットを低下

させるよう、例えば出血性ショック蘇生を2回繰り返すなどのモデルを検討する必要があると考えられたが生存を得ることが難しい可能性が示唆された。実際予備実験では30%出血蘇生を2回行なうと5%アルブミン群における安定した生存は得がたく、さらなる検討が必要であった。今後は出血性ショックの状態にある時間の延長、あるいは膠質浸透圧を有さない生理食塩水などに分散した試料による蘇生も検討する必要がある。

本実験で検討した盲腸穿孔後結紮モデルは高率に腸間膜リンパ節へ細菌移行が見られ、また敗血症を一過性にきたしている可能性もあり、SIRSを再現するモデルになり得る可能性が考えられた。このモデルにおいて人工赤血球を投与し、その影響を観察できる可能性が示唆された。また、このプロトコールにおいてサイトカイン測定を計画することが可能と考えられた。

#### D. 結論

出血性ショックからSIRSに至る過程において、腸管粘膜の破綻とそれに続く腸内細菌の腸間膜リンパ節への移行の関与が動物実験で示唆されている。昨年度本実験では、動物におけるSIRSモデル作成とサイトカイン測定に先立ち、上記報告の再現を試みたが、腸間膜リンパ節の培養で陽性結果は得られなかった。本年度行った盲腸結紮後穿孔モデルでは腸内細菌の腸間膜リンパ節への移行が高率に見られSIRSにおける人工赤血球投与時に影響を評価するモデルとしての応用が考えられた。

#### E. 研究業績

##### 1. 論文発表

1. Yamamoto M, Izumi Y, Horinouchi H, Teramura Y, Sakai H, Kohno M, Watanabe M, Kawamura M, Adachi T, Ikeda E, Takeoka S, Tsuchida E, Kobayashi K. Systemic Administration of Hemoglobin Vesicle Elevates Tumor Tissue Oxygen Tension and Modifies Tumor Response to Irradiation. *J Surg Res*. 2008 (in press).
2. Izumi Y, Gika M, Shinya N, Miyabashira S, Imamura T, Nozaki C, Kawamura M, Kobayashi K.

Hemostatic efficacy of a recombinant thrombin-coated polyglycolic acid sheet coupled with liquid fibrinogen, evaluated in a canine model of pulmonary arterial hemorrhage. *J Trauma*. 63:783-7, 2007.

3. Kuroda H, Kawamura M, Hato T, Kamiya K, Kawakubo M, Izumi Y, Watanabe M, Horinouchi H, Kobayashi K. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone after chemotherapy with vinorelbine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 (in press).
4. Izumi Y, Yamamoto M, Kawamura M, Adachi T, Kobayashi K. Cross-linked poly (gamma-glutamic acid) attenuates peritoneal adhesion in a rat model. *Surgery*. 141(5):678-81, 2007.
5. Oyama T, Kawamura M, Abiko T, Izumi Y, Watanabe M, Kumazawa E, Kuga H, Shiose Y, Kobayashi K. Hyperthermia-enhanced tumor accumulation and antitumor efficacy of a doxorubicin-conjugate with a novel macromolecular carrier system in mice with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 17(3):653-9, 2007.

## 2. 学会発表

1. 池田達彦、堀之内宏久、河野光智、泉陽太郎、渡辺真純、川村雅文、酒井宏水、宗慶太郎、土田英俊、小林紘一 / Resuscitation effect and longterm effect of Hb Vesicle on organ function in beagle dog / 第11回 International Symposium on Blood Substitutes/ 2007. 10 / 北京
2. 泉陽太郎、山田高成、小河アイリーン尚美、森崎浩、酒井宏水、堀之内宏久、武田純三、土田英俊、小林紘一 / Administration of Hemoglobin Vesicle under mechanical ventilation does not affect lung function/第11回 International Symposium on Blood Substitutes/ 2007. 10 / 北京
3. 堀之内宏久、相川直樹、河野光智、泉陽太郎、酒井宏水、宗慶太郎、小松晃之、土田英俊、小林紘一 / Change of cytokine production in intra-abdominal hemorrhage model-effect of Hemoglobin Vesicle/ 第11回 International Symposium on Blood Substitutes / 2007. 10 / 北京

分担課題：膜型人工肺回路における人工赤血球の機能評価

分担研究者 饗庭 了

慶應義塾大学医学部 心臓血管外科 講師

研究要旨

10kg を下回る新生児や乳児の開心術においては、患児の循環血液量に比較し人工心肺回路の用量が無視できない量となり、過度の血液希釈を回避するためには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。低体重の患者において無輸血充填を行った場合には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。この一方で、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。特に小児においては深刻な問題である。こうした臨床上のジレンマの一解決手段として、我々はヘモグロビン小胞体 (Hb 小胞体) に着目した。本研究では昨年度に引き続きラットを用いた人工心肺モデルを用いて脳機能への影響を検討した。Hb 小胞体充填が脳血流量に及ぼす影響とともに脳組織酸素分圧変化についても基礎的知見を得た。

A. 研究目的

同種血輸血による人工心肺回路充填は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一般に行われている。人工心肺回路の充填液は最低でも 300ml から 400ml 必要であり、これを晶質あるいは膠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可能性がある。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、輸血は様々な合併症のリスクを伴い、特に小児においては社会的にも大きな問題となっている。

この問題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 小胞体に着目した。本研究では昨年度に引き続きラットを用いた人工心肺モデルを用いて脳機能への影響を検討した。Hb 小胞体充填が脳血流量に及ぼす影響とともに脳組織酸素分圧変化についても基礎的知見を得た。

B. 研究方法

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、回路内に 5%アルブミンを充填した群 (HbV (-) 群)、小胞体を充填した群 (HbV (+) 群)、5%アルブミン群の 3 群に分けて実験を行った。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した。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った。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 分間行った。回路内充填量は約 60ml とした。

ドップラー血流計による脳血流測定モデルは報告されているが、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用いた。人工心肺充填液を人工赤血球・5%アルブミンの 2 種にて比較を行った。また、別の実験群にて脳組織酸素分圧測定を目的として脳表面に接触

型組織酸素分圧端子(栄光科学)の設置を試みた。

### C. 研究結果・考察

ドップラー血流計はオメガフローFLO-C1 (オメガウエーブ社製 Tokyo) 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 センチの円に切開し、さらに骨膜も切開し、頭蓋骨を露出したが、頭蓋骨自体は温存した。頭蓋骨露出部に接触型フロープローブでは血流量を安定して測定可能であった。

頭部を正中切開し、皮下組織を切開して頭頂骨及び前頭骨を露出。硬膜静脈洞を避けるため、右側頭頂部および左側頭頂部に 6mm 大の開頭を加えて硬膜を損傷しないように脳表を露出後接触型酸素分圧端子の装着が可能であった。脳組織酸素分圧は循環時間 90 分においてアルブミン分散 HbV (-) 群では前値の 103%、HbV 群では前値の 106% であった。これに対して 5%アルブミンでは 52% であった。

### D. 結論

昨年度に引き続き人工心肺回路の充填に Hb 小胞体を用い、ヒト赤血球とほぼ同様に脳組織への酸素供給能を持つことが示唆された。ラット人工心肺モデルにおいて脳血流量とともに脳組織酸素分圧をモニタリングする方向性が得られた。

### E. 研究業績

#### 1. 発表論文

1. Aeba R, Yozu R. Aortic translocation with autologous tissue. *Tex Heart Inst J*. 34:420-2, 2007.
2. Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. 'Working'cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res*.

313:2550-62, 2007.

3. 饗庭 了. editorial comment. 成田純任, 石川司朗, 石川友一, 中村真, 牛ノ濱大也, 佐川浩一, 總崎直樹, 中野俊秀, 角秀秋. Ross 手術後の中期遠隔期の心機能 -機械弁置換術との比較 心臓 39 : 1063, 2007.
4. Kudo M, Yozu R, Aeba R, Kokaji K, Kimura N, Iwanaga S. A case report of surgical correction for congenital mitral regurgitation with subvalvular apparatus abnormality. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 56:36-8, 2008.

#### (総説・著書など)

5. 饗庭 了. 心臓血管外科学テキスト 龍野勝彦、重松宏、幕内晴朗、四津良平、阿達秀雄 編著 ALCAPA p129-131.2007 中外医学社 版
6. 饗庭 了. 心臓血管外科学テキスト 龍野勝彦、重松宏、幕内晴朗、四津良平、阿達秀雄 編著修正大血管転位 p190-193.2007 中外医学社 版

#### 2. 学会発表

1. Okamoto K, Hida N, Miyoshi S, Nishiyama N, Ikegami Y, Kami D, Uyama T, Miyado K, Segawa K, Asada H, Yoshimura Y, Aeba R, Ogawa S, Umezawa A, Yozu R / Human Mesenchymal Stem Cell from Human Chorionic Villi is a New Cell Source for Autologous Cardiac Stem Cell Therapy / 第 71 回日本循環器学会 / 2007. 3 / 神戸
2. Okamoto K, Hida N, Miyoshi S, Nishiyama N, Ikegami Y, Kami D, Uyama T, Miyado K, Segawa K, Asada H, Yoshimura Y, Aeba R, Ogawa S, Umezawa A, Yozu R / Human Mesenchymal Stem Cell from Human Chorionic Villi is a New Cell Source for Autologous Cardiac Stem Cell Therapy / The 56th Annual meeting of American College of Cardiology / 2007.3 / New Orleans, USA
3. Aeba R, Yozu R / Poster. Ross-Konno Procedure for patients with Shone complex / Historic inaugural meeting of The World Society for Pediatric and Congenital Heart Surgery / 2007,5 / Washington DC, USA