

JSIVA賞

プロポフォールとデクスメデ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

小竹良文* 鈴木武志* 長田大雅*
山田高成* 武田純三*

【要旨】筆者らは人工呼吸中の鎮静薬として、プロポフォールとデクスメデトミジンを併用している。本報告では心臓外科術後患者を対象として、両者の投与量を retrospective に検討した。Ramsay sedation scale 5 を目標として鎮静した場合、プロポフォール、デクスメデトミジンの投与量はそれぞれ 1.83 ± 0.73 mg/kg/hr, 0.25 ± 0.11 μ g/kg/hr であり、血中濃度はそれぞれ 0.98 ± 0.42 μ g/ml, 0.34 ± 0.17 ng/ml であった。離脱時のプロポフォールの投与量は 1.30 ± 0.64 mg/kg/hr, 血中濃度は 0.43 ± 0.11 μ g/ml であり、デクスメデトミジンの投与量、血中濃度には大きな変化はなかった。併用によって両者の投与量を、単独投与の場合と比較して減量することが可能であった。

キーワード：デクスメデトミジン、プロポフォール、鎮静

(日臨麻会誌 Vol.27 No.4, 351 ~ 357, 2007)

はじめに

デクスメデトミジンは α_2 受容体作動薬であり、新しいタイプの鎮静薬である^{1),2)}。デクスメデトミジンの利点として呼吸抑制作用がない点、抗侵害刺激作用があり、鎮痛剤の使用量を減量できる点、投与中も容易に覚醒させることが可能な点、代謝速度が速く、持続投与速度の調節によって鎮静レベルの調節が可能な点などがあげられている。さらに中枢神経への保護作用、腎保護作用などの可能性も指摘されている^{3),4)}。一方、重症患者への使用にあたっては、 α_2 受容体刺激作用に由来する血圧低下、徐脈

などの血行動態への影響を考慮する必要がある。特に投与開始時には作用発現に必要な血中濃度を達成するために高用量を必要とし、この段階で低血圧をはじめとする血行動態への影響が生じやすいとされている。また高用量投与の場合、血管平滑筋への直接作用が降圧作用を上回り、一過性の高血圧をきたすことも報告されている⁵⁾。さらに、過剰鎮静の弊害は広く指摘されており⁶⁾、調節性に優れた鎮静は有利であるが、必要な時期に的確に覚醒させることが可能であれば、途中の見当識の有無には大きな意義があるかどうかについても定かではない。デクスメデトミジンは前述したように、理論的には従来広

*慶應義塾大学医学部麻酔学教室、一般集中治療室

著者連絡先 小竹良文
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35
慶應義塾大学医学部麻酔学教室

表1 Modified Ramsay sedation score (RSS)

Sedation score	Clinical response
0	Paralyzed, unable to evaluate
1	Awake
2	Lightly sedated
3	Moderately sedated, follows simple commands
4	Deeply sedated, responds to nonpainful stimuli
5	Deeply sedated, responds only to painful stimuli
6	Deeply sedated, unresponsive to painful stimuli

〔文献9),10)より引用〕

く用いられているプロポフォールより優れた点が多いものの、両者の直接比較においては必ずしも優位性が示されないのもこれらの問題点が解消されないためである可能性がある⁷⁾。

ただし、これまでのデクスメドミジンに関する報告のほとんどは単独投与における検討であり、他の鎮静剤、特にプロポフォールとの併用に関する報告は少ない⁸⁾。筆者らはデクスメドミジンとプロポフォールを併用することによって両者の長所を生かし、多くの問題点を解消できる可能性があると考え、心臓外科術後症例を中心にその有用性を検討した。本稿ではこれらの症例におけるデクスメドミジンとプロポフォールの血中濃度をシミュレーションにより retrospective に解析した結果を報告する。

I 対象および方法

本研究にあたっては慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得るとともに、患者からの了承を得た。本報告の解析対象は、2005年8月から12月の間に慶應義塾大学病院一般集中治療室においてプロポフォールとデクスメドミジン併用による鎮静を行った心臓大血管術後患者のうち、以下の条件に合致する症例とした。すなわち、ICUにて1日呼吸管理を行い、術後第一病日に離脱した18歳以上の患者で動脈内バルーンパンピング、持続的血液浄化法等の補助手段を使用しなかった症例とした。具体的には麻

酔からの覚醒を確認した後、プロポフォールによる鎮静を開始し、プロポフォール投与量10ml/hr以上を目安としてデクスメドミジン併用を開始することとした。デクスメドミジン投与については初期投与を行わず、通常の持続投与量の範囲内で投与を開始した。投与中の鎮静度の評価はRamsay sedation score (RSS, 表1^{9),10)}を指標として、看護師が行い、離脱開始まではRSS 5を目標として調節した。人工呼吸からの離脱過程においては離脱直前にはRSS 3かつ低レベルのpressure supportでPaCO₂<50mmHgとなるよう投与量を調節した。

プロポフォールおよびデクスメドミジンの血中濃度はRugloop software (<http://www.demed.be/>)を用いてシミュレーションした。シミュレーションに用いた薬物体内動態パラメータはMarsh¹¹⁾およびDyck¹²⁾のものをそれぞれ用いた。

結果は平均±標準偏差で表示し、プロポフォールとデクスメドミジンの投与量および血中濃度に関して相関関係の有無を検討した。

II 結果

該当する期間にプロポフォールとデクスメドミジン併用による鎮静を行った心臓大血管術後患者は53例であり、そのうち13例が条件を満たし解析の対象となった。これらの症例の背景因子を表2に示した。Ramsay sedation scale 5を目標として鎮静

表2 背景因子

年齢(歳)	56 ± 12
性別(男/女)	7/6
身長(cm)	162 ± 9
体重(kg)	60 ± 12
手術時間(min)	365 ± 75

結果は平均±標準偏差で表示した。

した場合、プロポフォール、デクスメデトミジンの投与量はそれぞれ $1.83 \pm 0.73 \text{mg/kg/hr}$ 、 $0.25 \pm 0.11 \mu\text{g/kg/hr}$ であり、血中濃度はそれぞれ $0.98 \pm 0.42 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.34 \pm 0.17 \text{ng/ml}$ であった。離脱時のプロポフォールの投与量は $1.30 \pm 0.64 \text{mg/kg/hr}$ 、血中濃度は $0.43 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ であり、デクスメデトミジンの投与量、血中濃度に大きな変化はなかった。また、各症例におけるプロポフォールとデクスメデトミジンの投与量および血中濃度の関係を図1および図2に示した。デクスメデトミジンとプロポフォールの投与量、血中濃度とも負の相関を示唆する結果が得られたが、統計学的解析の結果、最大鎮静中におけるプロポフォールとデクスメデトミジンの投与量が最も大きな相関係数 $r^2 = 0.24$ を示したものの、統計学的有意水準には至らなかった($p = 0.08$)。

臨床的にはデクスメデトミジン投与開始時を含めた併用期間中に有意な血行動態の変化を認めず、また離脱時に過剰鎮静に由来する低換気、浅鎮静による興奮のいずれも認めず、順調な離脱が可能であった。麻薬性鎮痛薬の併用に関しては、今回検討した13例中、人工呼吸中に鎮痛薬の併用を必要とした症例は1例であった。

Ⅲ 考 察

本研究の結果、プロポフォール単独投与によりRSS 5程度の鎮静を必要とする症例でプロポフォールの増量が必要となった場合、低用量のデクスメデトミジンを併用することによって必要な鎮静が得られること、および人工呼吸器からの離脱に際しては

デクスメデトミジン投与を継続したまま、プロポフォールを減量することによってスムーズに離脱が図れることが示された。すなわち、両者の併用は安全かつ有用である可能性が示唆された。また両薬剤の血中濃度をシミュレートした結果、興味ある知見が得られた。

呼吸管理中に適切な鎮静レベルを維持することの重要性は広く認識されている^{13),14)}。この目的を達成するために従来ベンゾジアゼピンまたはプロポフォールと麻薬性鎮痛薬の併用が一般的に用いられてきたが、最近デクスメデトミジンが使用可能となった。これらの選択肢のうち、心臓外科手術後を含めた短期間の呼吸管理の場合、調節性に優れるプロポフォールまたはデクスメデトミジンが使用される場合が多い。ただし、調節性以外の面では両者の間には差がある。なかでもデクスメデトミジンには呼吸抑制作用がなく、人工呼吸器からの離脱後にも使用できる点、麻薬性鎮痛薬の作用を増強し、抗侵害刺激作用を有する点、刺激によって容易に覚醒させ、意思疎通を図ることが可能な点、propofol infusion syndromeのような重篤な合併症が指摘されていない点などが利点と考えられる。実際、Vennらは15時間以内の短時間の鎮静を行った患者においてこの両者を比較した結果、血圧、人工呼吸離脱までの時間、副作用の頻度には有意差を認めなかったが、鎮痛剤の追加投与量、心拍数およびrate pressure product、呼吸管理中の PaCO_2 、患者の協調性、主治医および患者の印象の点ではデクスメデトミジンが有利であったと報告している¹⁵⁾。また、Herrらは冠動脈バイパス患者を対象とする多施設比較試験において人工呼吸離脱までの時間には有意差を認めなかったが、平均動脈圧、心拍数およびモルヒネの追加投与量はデクスメデトミジン群で有意に低く、 β 遮断薬、非ステロイド消炎鎮痛薬、制吐薬、エピネフリンおよび利尿薬の大量投与を必要とした症例も少なかったと報告している¹⁶⁾。

ただし、デクスメデトミジンについては手術中か

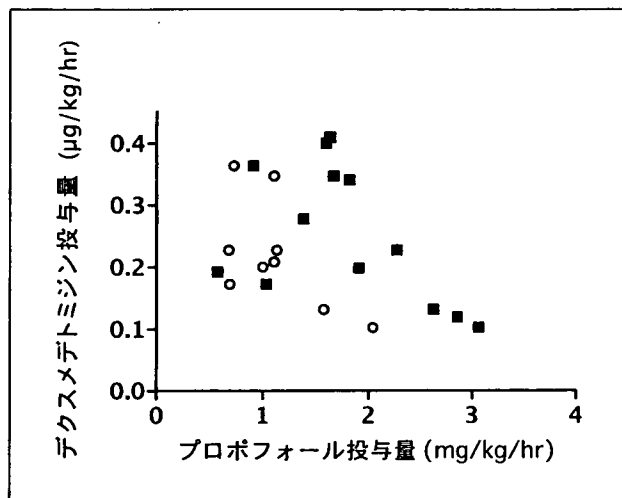


図1 プロポフォールとデクスメドミジン併用時の投与量の関係

RSS 5を目標とした最大鎮静時の投与量を closed square (■)で, RSS 3を目標とした離脱時の投与量を open circle (○)で示した(それぞれn=13).

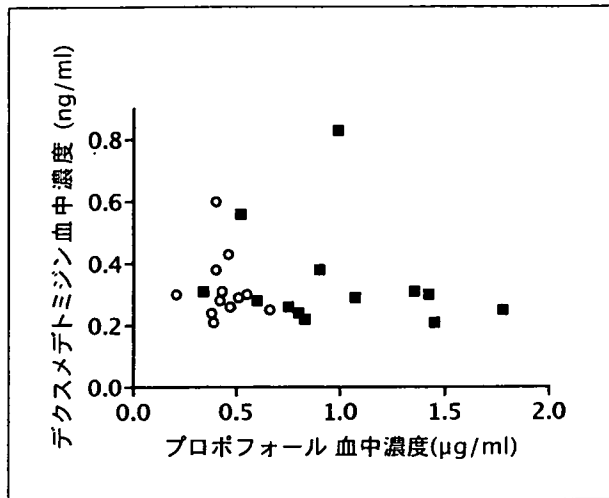


図2 プロポフォールとデクスメドミジン併用時の血中濃度の関係

RSS 5を目標とした最大鎮静時の血中濃度を closed square (■)で, RSS 3を目標とした離脱時の血中濃度を open circle (○)で示した(それぞれn=13).

らの投与が適応外である点, 術後呼吸管理開始時に必要な血中濃度を達成するために初期投与を必要とし, この時点で血圧低下, 徐脈あるいは反射性の血圧上昇など血行動態への影響が著明に生じる場合がある点が危惧される。また前述した報告とは異なり, デクスメドミジンよりもプロポフォールの方が患者の印象が良好であったとする報告もみられる⁷⁾。冠動脈バイパス患者を対象としたこの報告では, デクスメドミジン群で人工呼吸離脱までの時間が有意に短く, 心拍数も少なかったものの, ミダゾラム, フェンタニルの使用量に関しては両群間に有意差がなく, 疼痛, 人工呼吸中の不快感および熟睡感の点でプロポフォール群の方が優れていたと報告されている。

これらの報告から, プロポフォール, デクスメドミジンのどちらか一方が有意に優れている可能性は少なく, 重症患者の鎮静薬として両者が用いられていくものと予想する。そこで今後の適切な鎮静方法の可能性の一つとして, 本研究では両者の併用に着目した。具体的には, 集中治療室入室直後は血行

動態の安定を優先しプロポフォールを主体として鎮静を行い, 人工呼吸器からの離脱時期には覚醒の良さ, 呼吸抑制の少なさというデクスメドミジンの利点を生かした鎮静に切り替えるのが有利であると考えた。さらに, 切り替えにあたって両者の併用期間を設けることによってデクスメドミジンの初期投与を省略し, 血行動態への悪影響が避けられると予想した。

実際には呼吸管理開始後プロポフォール投与を開始したうえで, さらにデクスメドミジンを初期投与なしで0.25µg/kg/hr程度投与することによって, 両者の利点を生かしつつ, 副作用を回避し, 適切な鎮静を維持することが可能であった。この場合, プロポフォール投与量を調節することによって鎮静度を容易に調節することができた。特に併用による利点として, プロポフォールの増量によって容易に鎮静を深くすることが可能な点と, 離脱期にプロポフォールの投与量が低いにもかかわらず安定した鎮静が維持できる点, および麻薬性鎮痛薬の併用量が少なく済む点をあげたい。気管チューブの抜去にあ

たつては覚醒状態、血行動態、呼吸状態といった患者側の条件のみならず、看護スタッフの業務、胸部X線を含む検査結果の入手など、考慮しなければならない因子が多い。併用によりプロポフォール投与中止後短時間で気管チューブ離脱が可能な状態となるため、日常業務の効率化にも寄与するものと予想する。また、麻薬性鎮痛薬の併用がほとんど必要ない点も特徴的であり、これまでの報告におけるデクスメデトミジン単独投与群においてもかなりの割合の症例がアルフェentanil、フェンタニル、モルヒネを併用していることと対照的である。

両者の併用に関しては、Triltschらの報告がある⁸⁾。具体的には、デクスメデトミジンを初期投与 $6\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ で10分間投与した後、Bispectral Index (BIS, Aspect Medical Systems, 米国)値を60から70に維持するよう $0.1\sim 0.7\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ の範囲内で調節している。この報告ではプラセボ群においてプロポフォールを離脱開始前には $1.52\pm 0.3\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ 、離脱時には $0.62\pm 0.21\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ で併用しているのに加えて、モルヒネの追加投与が必要であった。一方、デクスメデトミジン群におけるデクスメデトミジンの投与量は明記されていないものの、平均14.3時間の投与期間中に $7.3\mu\text{g}/\text{kg}$ が投与されており、平均投与速度は $0.51\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ と推定できる。デクスメデトミジン群におけるプロポフォールの投与量は離脱開始前に $0.87\pm 0.21\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ 、離脱時には $0.17\pm 0.06\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ であり、モルヒネの使用量も1/3程度であったと報告している。今回の研究とTriltschらの報告におけるデクスメデトミジン群とでは、デクスメデトミジンとプロポフォールを使用する順序が異なっているため、両者の投与速度には相違がみられる。しかし、両研究のいずれもがプロポフォールとデクスメデトミジンの併用によって投与量を単独投与の場合よりも減量できる点で一致している。さらに平均値を見るかぎり、両研究から得られた併用時の投与量の関係が類似している可能性が高い。すなわち、今回の研究で得られた併用時の両薬剤の投

与量の関係は、デクスメデトミジン投与量が2倍程度までは維持される可能性が示唆される。

人工呼吸中にプロポフォールあるいはデクスメデトミジンを用いた場合の血中濃度に関しては、これまでいくつかの報告がなされている。Knibbeらは心臓外科術後患者を含むICU入室患者において、プロポフォール血中濃度が $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の場合、ほとんどの場合でRSS 6、血中濃度が $0.75\sim 1.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合はRSS 5である確率は20~40%で残りがRSS 6、血中濃度が $0.4\sim 0.75\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合はRSS 5または6である確率がそれぞれ20~40%で、残りがRSS 4以下、血中濃度が $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の場合にはほとんどの場合でRSS 2または3と報告している¹⁷⁾。一方、BarrらはRSS 2, 3, 4, 5, 6を維持しうる確率が50%以上となる血中濃度(C50, $\text{RSS} > n$)を算出しており、それぞれ0.13, 0.5, 0.74, 1.48, 2.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と報告している¹⁰⁾。食道癌術後患者を対象としたTakizawaらの報告ではRSS 3を目標に投与した場合の投与量の平均は $1.74\pm 0.82\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ 、血中濃度の平均は $0.85\pm 0.24\mu\text{g}/\text{ml}$ であった¹⁸⁾。デクスメデトミジンに関しては初期投与 $2.5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ で10分間投与した後、 $0.7\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ で投与した場合、RSSの平均値が4で血中濃度が $1.12\pm 0.3\text{ng}/\text{ml}$ であったと報告されている¹⁹⁾。

前述したように投与量と血中濃度およびRSSの関係、すなわちプロポフォールの薬物体内動態および薬力学は報告によって差があり、今回の結果をこれまでの報告に外挿することは必ずしも容易ではないが、血中濃度の点から見ても目標とするRSSを達成するために必要なプロポフォールの血中濃度は併用によって減少することが推察される。一方、デクスメデトミジンに関して血中濃度とRSSとの関係に関する報告は少なく、今回結果的に用いられた $0.25\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 前後の投与量とその結果の $0.3\sim 0.35\text{ng}/\text{ml}$ 程度の血中濃度が有意な臨床効果を示すかどうかについては明らかではない。しかし、同程度の低用量および低濃度デクスメデトミジンの薬理作用を検討し

たHallらの報告によると、 $6\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ の初期投与の後、 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ と $0.6\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 投与下での鎮静度、記憶、鎮痛作用を比較し、この2つの投与量いずれにおいても同程度の効果が得られることが示されている²⁰⁾。したがって、本研究で用いた初期投与省略、低用量投与という方法でも、十分ではないものの有意な鎮痛作用を示すであろうことが示唆される。

本研究にもいくつかの限界が存在する。まず、少数例によるobservational studyであり、単独投与との比較を行っていない点があげられる。しかし、本研究で用いた、プロポフォール持続投与から開始しデクスメドミジンを追加するとともに、人工呼吸離脱時にはプロポフォールを減量する方法はこれまで報告されておらず、preliminaryな報告としての意義はあると考える。また、血中濃度が実測値ではなく、あくまで予測値であることも本研究の限界であろう。さらに、本研究においてプロポフォールの血中濃度予測に用いたMarshらのパラメータはDiprifusorとして商品化されており、汎用性は高いものの、重症患者における薬物体内動態は麻酔中の患者から得られたパラメータと異なる可能性が指摘されている¹⁰⁾。また、Ickeringillらの報告によると初期投与を省略することによって血行動態への悪影響を防止できたとされており²¹⁾、血行動態を詳細に検討することにより、併用によるさらなる利点が見出せるかもしれない。このほか、人工呼吸離脱に必要な時間、さらには鎮静に関する患者および医療スタッフの満足度などについても今後の検討課題である。

結論として、心臓大血管術後の鎮静にプロポフォールとデクスメドミジンを併用した。投与量、血中濃度とも単独投与の際と比較して少ない量で鎮静が可能であった。ICUにおける鎮静の一手段として両者の併用は有用である可能性が高い。

参考文献

- 1) Kamibayashi T, Maze M : Clinical uses of alpha2-adrenergic agonists. *Anesthesiology* 93 : 1345-1349, 2000
- 2) 坂口嘉郎, 高橋成輔 : デクスメドミジン (dexmedetomidine). *麻酔* 55 : 856-863, 2006
- 3) Ma D, Hossain M, Rajakumaraswamy N, et al. : Dexmedetomidine produces its neuroprotective effect via the alpha 2A-adrenoceptor subtype. *Eur J Pharmacol* 502 : 87-97, 2004
- 4) Frumento RJ, Logginidou HG, Wahlander S, et al. : Dexmedetomidine infusion is associated with enhanced renal function after thoracic surgery. *J Clin Anesth* 18 : 422-426, 2006
- 5) Talke P, Lobo E, Brown R : Systemically administered alpha2-agonist-induced peripheral vasoconstriction in humans. *Anesthesiology* 99 : 65-70, 2003
- 6) Kress JP, Pohlman AS, O'Connor MF, et al. : Daily interruption of sedative infusions in critically ill patients undergoing mechanical ventilation. *N Engl J Med* 342 : 1471-1477, 2000
- 7) Corbett SM, Rebuck JA, Greene CM, et al. : Dexmedetomidine does not improve patient satisfaction when compared with propofol during mechanical ventilation. *Crit Care Med* 33 : 940-945, 2005
- 8) Triltsch AE, Welte M, von Homeyer P, et al. : Bispectral index-guided sedation with dexmedetomidine in intensive care : a prospective, randomized, double blind, placebo-controlled phase II study. *Crit Care Med* 30 : 1007-1014, 2002
- 9) Ramsay MA, Savege TM, Simpson BR, et al. : Controlled sedation with alphaxalone-alphadolone. *Br Med J* 2 : 656-659, 1974
- 10) Barr J, Egan TD, Sandoval NF, et al. : Propofol dosing regimens for ICU sedation based upon an integrated pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Anesthesiology* 95 : 324-333, 2001
- 11) Marsh B, White M, Morton N, et al. : Pharmacokinetic model driven infusion of propofol in children. *Br J Anaesth* 67 : 41-48, 1991
- 12) Dyck JB, Maze M, Haack C, et al. : Computer-controlled infusion of intravenous dexmedetomidine hydrochloride in adult human volunteers. *Anesthesiology* 78 : 821-828, 1993
- 13) 小竹良文 : ICUにおける鎮静と鎮痛. *LiSA* 9 : 884-891, 2002
- 14) 小竹良文, 武田純三 : Sedation, Analgesia, Neuromuscular blockade. *ICUとCCU* 28 : 849-852, 2004

- 15) Venn RM, Grounds RM : Comparison between dexmedetomidine and propofol for sedation in the intensive care unit : patient and clinician perceptions. *Br J Anaesth* 87 : 684-690, 2001
- 16) Herr DL, Sum-Ping ST, England M : ICU sedation after coronary artery bypass graft surgery: dexmedetomidine-based versus propofol-based sedation regimens. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 17 : 576-584, 2003
- 17) Knibbe CA, Zuideveld KP, DeJongh J, et al. : Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of propofol for long-term sedation in critically ill patients : a comparison between propofol 6% and propofol 1%. *Clin Pharmacol Ther* 72 : 670-684, 2002
- 18) Takizawa D, Sato E, Nishikawa K, et al. : Plasma concentration for optimal sedation and total body clearance of propofol in patients after esophagectomy. *J Anesth* 19 : 88-90, 2005
- 19) Venn RM, Karol MD, Grounds RM : Pharmacokinetics of dexmedetomidine infusions for sedation of postoperative patients requiring intensive care. *Br J Anaesth* 88 : 669-675, 2002
- 20) Hall JE, Uhrich TD, Barney JA, et al. : Sedative, amnestic, and analgesic properties of small-dose dexmedetomidine infusions. *Anesth Analg* 90 : 699-705, 2000
- 21) Ickeringill M, Shehabi Y, Adamson H, et al. : Dexmedetomidine infusion without loading dose in surgical patients requiring mechanical ventilation : haemodynamic effects and efficacy. *Anaesth Intensive Care* 32 : 741-745, 2004

Retrospective Analysis of Dosage and Plasma Concentration of Combined Administration of Propofol and Dexmedetomidine in Postoperative Cardiac Patients

Yoshifumi KOTAKE, Takeshi SUZUKI, Hiromasa NAGATA,
Takashige YAMADA, Junzo TAKEDA

Department of Anesthesiology, School of Medicine, Keio University

We currently use a combination of propofol and dexmedetomidine as sedative agents during mechanical ventilation. This practice may attenuate undesirable cardiovascular effects while maintaining adequate sedation and prompt waking. In this retrospective analysis, the dosage of each agent and estimated blood concentration were reported in 13 postsurgical cardiac patients. During mechanical ventilation, the dosage of propofol and dexmedetomidine, titrated to achieve a score of 5 on the Ramsay sedation scale, were 1.83 ± 0.73 mg/kg/hr and 0.25 ± 0.11 μ g/kg/hr, respectively. The corresponding plasma concentration were 0.98 ± 0.42 μ g/ml and 0.34 ± 0.17 ng/ml. During weaning from mechanical ventilation, the dosage and plasma concentration of propofol were 1.30 ± 0.64 mg/kg/hr and 0.43 ± 0.11 μ g/ml, respectively, while the dosage and plasma concentration of dexmedetomidine were almost identical to those of the pre-weaning period. In conclusion, the coadministration of propofol and dexmedetomidine enables us to reduce the dosage of each drug while maintaining adequate sedation.

Key Words : Dexmedetomidine, Propofol, Sedation

短 報

Mulvihill-Smith 症候群の麻酔経験

栗林 淳也* 山田 達也* 森崎 浩* 武田 純三*

キーワード▶ Mulvihill-Smith 症候群, 早老症様症候群, 全身麻酔

Mulvihill-Smith 症候群は, 老化が異常に早期にくる早老症様症候群に属する非常にまれな症候群である。老人様顔貌, 低身長, 小頭, 色素性母斑, 免疫不全, 難聴, 高い調子の声を主徴とする。麻酔管理上の考慮すべき点として, 換気困難, 挿管困難, 早期の加齢性変化に対する配慮が挙げられる。今回, 本症候群の麻酔管理を経験したので報告する。

1. 症 例

27 歳, 女性, 身長 138.5 cm, 体重 27 kg

下顎骨嚢胞, 舌腫瘍に対して嚢胞摘出術, レーザー舌部分切除が予定された。また, 帯状角膜変性に対して, 角膜移植も併せて予定された。

現症: 特異的な老人様顔貌, 小頭, 軽度の小顎を認めた (図)。Mallampati の分類では class II であった。全身の色素性母斑, 高い調子の声, 難聴を有していたが, 免疫不全はなかった。糖尿病を合併しており, 経口血糖降下薬で HbA1c 7.4%, 空腹時血糖は $180\text{--}190\text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ 程度にコントロールされていた。心電図上, ST-T 変化を認めたが, 心エコーでは左室後壁の軽度の肥厚があるのみで, 特に壁運動や弁の異常はなかった。手術歴に腭尾部腫瘍に対する腭体尾部・脾臓合併切除 (22 歳時), 角膜混濁に対する角膜移植 (26 歳時) があった。

2. 麻酔経過

麻酔前投薬なし。入室時の血圧は $180/106\text{ mmHg}$ と高値であった。麻酔導入はフェンタニル

0.05 mg , プロポフォール 50 mg , ベクロニウム 3 mg の静注で行った。意識消失後, 小児用マスクで手動的に換気を開始したが, マスクが顔に比べて大きく換気困難であったため, 乳児用マスクに変更したところ, 換気可能となった。気管挿管は比較的容易で, Macintosh No. 2 の喉頭鏡で喉頭展開したのち, 内径 6 mm の気管チューブを経口挿管した。Cormak の分類で grade III であった。麻酔維持は亜酸化窒素 $4\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$, 酸素 $2\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$, (角膜移植後は酸素濃度 100%), セボフルラン 1.0-5.0% にフェンタニル総量 0.175 mg の静注を併用した。導入後血圧は $82/42\text{ mmHg}$ まで低下し, 手術開始に伴い血圧は $195/110\text{ mmHg}$ まで上昇したが, その後は収縮期血圧 $100\text{--}130\text{ mmHg}$ 程度で調節された。抜管時に血圧が $205/117\text{ mmHg}$ まで上昇したため, ニカルジピン総量 1.0 mg を静注した。退室時の血圧は $168/94\text{ mmHg}$, 心拍数 $89\text{ beats}\cdot\text{min}^{-1}$ であった。手術時間は 2 時間 50 分, 麻酔時間は 4 時間 20 分で, 集中治療室において術後管理を行った。血糖値が一過性に $221\text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ に上昇したため, インスリン 2 単位を皮下注した。血圧は収縮期血圧 $120\text{--}140\text{ mmHg}$ 程度で落ち着いており, 術翌日朝に一般病棟に転床となった。その後は特に問題はなく, 術後 9 日目に軽快退院となった。

3. 考 察

Mulvihill-Smith 症候群は, 少なくとも 30 以上ある早老症様症候群に属する非常にまれな疾患である。2005 年の Ferri ら¹⁾の報告まで, 本邦での 1 症例を含む 8 症例 (男性 5 人, 女性 3 人) の報告があるが, 手術麻酔経験に関する報告はない。

* 慶應義塾大学医学部麻酔学教室

2006 年 10 月 12 日受領: 2006 年 11 月 14 日掲載決定



図 患者の全身および顔写真
小頭, 軽度の小顎を認める。

報告は 1 症例を除いてすべて両親の血縁関係のない孤発症例である。Ohashi ら²⁾の症例では、いところ(親族間)結婚であったことから、常染色体劣勢遺伝が示唆される。de Silva ら³⁾は父親の年齢が高いことから、常染色体優性の突然変異を指摘している。

早老症様症候群は乾燥したしわのある皮膚、皮膚色素沈着、減少した皮下脂肪、禿、性機能不全、細胞性・液性免疫能低下を示す。根本的な治療はなく、各症状に対しての対症療法が主体となる⁴⁾⁵⁾。

本症例は Mallampati の分類では class II であったが、特徴的な老人様顔貌で顔面の下半分の発達が悪く、顎が小さく尖っており、換気困難と挿管困難の可能性があった。全身麻酔導入後の用手換気は、小児用マスクが顔に比し大きかったため困難であったが、乳児用マスクでは容易に換気することができた。当初、口腔内の操作があるため、経鼻気管挿管を予定していたが、小さな鼻孔に合うサイズの気管チューブではエアリークが多くなり、換気困難や術野を妨げる可能性があったため、経口気管挿管とした。気管挿管自体は Cormack の分類で grade III であり、BURP などの手段を用いることにより挿管可能であった。

麻酔導入時、手術開始時、抜管時の血圧の変動が大きかった。これが本症候群そのもの、あるいは合併する糖尿病による動脈硬化によるかは、術前に pulse wave velocity⁶⁾といった動脈硬化の指標を測定していなかったので不明である。この症候群における動脈硬化に関する報告はないが、同様に早老症様症候群に属するハッチンソン・ギルフォード症候群 (progeria) では 10 歳代で動脈硬化を来し、冠動脈閉塞で死亡することが多いと報告⁷⁾されている。ハッチンソン・ギルフォード症候群の麻酔経験は本邦でも報告⁸⁾があり、手術操作とは無関係に 30 分間一過性に房室結節調律が出現し、軽度の血圧低下と脈拍数減少が見られ、冠動脈病変の関与がその原因として示唆されている。本疾患が早老症様という同様のカテゴリーに属していることから、ある程度の動脈硬化はあると考えられ、麻酔中の循環動態には注意すべきである。

Mulvihill-Smith 症候群は小頭、小顎を合併するため、difficult airway を念頭においた術前診察と評価および気道管理対策を講じておくべきである。また、動脈硬化を来している可能性があるため、その評価および注意深い循環管理が必要である。

引用文献

- 1) Ferri R, Lanuzza B, Cosentino FI, Iero I, Russo N, Tripodi M, et al. Agrypnia excitata in a patient with progeroid short stature and pigmented Nevi (Mulvihill-Smith syndrome). *J Sleep Res* 2005 ; 14 : 463-70.
- 2) Ohashi H, Tsukahara M, Murano I, Fujita K, Matsura S, Fukushima Y, et al. Premature aging and immunodeficiency : Mulvihill-Smith syndrome? *Am J Med Genet* 1993 ; 45 : 597-600.
- 3) de Silva DC, Wheatley DN, Herriot R, Brown T, Stevenson DA, Helms P, et al. Mulvihill-Smith progeria-like syndrome : a further report with delineation of phenotype, immunologic deficits, and novel observation of fibroblast abnormalities. *Am J Med Genet* 1997 ; 69 : 56-64.
- 4) Bartsch O, Tymper KD, Schwinger E, Gorlin RJ. Mulvihill-Smith syndrome : case report and review. *J Med Genet* 1994 ; 31 : 707-11.
- 5) 園田 徹. Mulvihill-Smith 症候群. 日本臨牀別冊 先天異常症候群 2001 ; 下巻 : 219-20.
- 6) 高沢謙二. 大動脈脈波速度 (AoPWV). *医学のあゆみ* 2002 ; 202 : 641-5.
- 7) 泉川良範. 早老症. 日本臨牀別冊 先天異常症候群 2001 ; 下巻 : 532-3.
- 8) 有吉俊一, 萬屋勇治, 緒方良治, 福井 滋, 長谷場純敬, 後藤 裕. Hutchinson-Gilford 症候群の麻酔経験. *麻酔* 1987 ; 36 : 422-6.

ABSTRACT

Anesthetic Management of a Patient with
Mulvihill-Smith Syndrome

Junya KURIBAYASHI, Tatsuya YAMADA,
Hiroshi MORISAKI, Junzo TAKEDA

*Department of Anesthesiology, School of Medicine,
Keio University, Tokyo 160-8582*

Mulvihill-Smith syndrome is a rare disease that belongs to progeroid syndromes. This syndrome is characterized by a senile face with an underdeveloped lower half, short stature, microcephaly, multiple pigmented nevi, immunodeficiency, hearing loss, and high-pitched voice. We report anesthetic management of a 27-year-old woman, 138 cm and 27 kg, with this syndrome, who underwent removal of mandibular cyst, partial resection of tongue and keratoplasty. Anesthesia was induced with fentanyl, propofol and vecuronium. There was difficulty in maintaining adequate ventilation with a face mask for children, and we used a mask for infants. Her Cormack grade was rated 3 but her trachea could be intubated assisted by BURP procedure. Anesthesia was maintained with sevoflurane, nitrous oxide and oxygen supplemented with fentanyl. The changes of blood pressure during anesthesia were extraordinary, suggesting the presence of advanced arteriosclerosis. The postoperative course was uneventful, with stable hemodynamics, and the patient was discharged from the hospital on 9th postoperative day. Anesthesia for Mulvihill-Smith syndrome should be performed with caution for the potential risk of difficult airway and unstable hemodynamics.

key words : Mulvihill-Smith syndrome, progeroid syndromes, general anesthesia

特集にあたって

慶應義塾大学麻酔学教室 武田 純三

医療の質を求めるのは医師も患者も同じである。患者の立場からは「麻酔」はみえにくい存在の医療である。麻酔による合併症を起こすと、理解されにくく、医療不信から訴訟につながりやすい。このような理由から質のよい麻酔法、麻酔関連薬、低侵襲モニターは切望される場所であるが、近年これらの要求にこたえるかのように、新たな薬剤、投与方法、モニターの開発がなされてきている。

今回薬剤として、新たに導入された、あるいは導入されようとしている4つの薬を取り上げた。レミフェンタニルは、本年1月より使用ができるようになった、短時間作用型の麻酔性鎮痛薬である。デクスメドトミジンも2004年より使用が可能となった鎮静薬で、呼吸抑制がない、 α_2 受容体特異性が高いなどの特徴ある薬剤であり、その使い方についてはまだ模索が続いている。ロクロニウムは海外では10年以上前から使われている筋弛緩薬である。日本では諸般の事情から、世界で唯一使用できない国になっているが、本年度中には使用可能となる予定である。スガマデックスは、世界と同時に日本でも治験が始まり、日本ではすでに終了している。体内で筋弛緩薬と結合(包摂)

して、筋弛緩薬の作用を不活性化する、新しいコンセプトに基づく薬剤で、SRBA (Selective Relaxant Binding Agent) との概念が構築されている。

投与方法にも新しい仕組みが導入されている。作用持続時間が短い薬剤の開発により、持続注入が容易となり、静脈麻酔薬のみによる麻酔法の普及が進んでいる。TCI (Target Controlled Infusion) は、専用の持続注入器も一般化して、普及してきている投与方法である。また、手術患者の関心事は、手術の成功と術後の痛みであろう。手術をしたのだから痛いのは当たり前時代から、痛くない術後を提供することが要求され、また提供できるようになってきた。そのなかで、PCA (自己調節鎮痛) ポンプは痛くない術後を提供できる強力な手段の1つである。しかし、監視の目が十分でない病棟で使用されるため、患者の安全を担保するためには、それなりのケアを必要とする。

術中のモニターは、麻酔中の患者の安全を保つために必須の手段である。現在普及しているパルスオキシメータは、非侵襲モニターとして大きな役割を果たしてきた。これに続くかのように、低侵襲、非侵襲モニターの開発が進んでいる。TEE (経食道心エコー) は

開心術では必須のモニターとなっているばかりか、心疾患を有する非開心術患者でのモニターとしても重要な位置を占めてきている。しかし、TEEが本来の役割を果たすためには、TEEに対する十分な知識と経験を有する医師の存在が不可欠である。現在、日本心臓血管麻酔学会が後ろ盾となって、周術期TEE認定試験を行い、TEEの普及と技術の向上を目指している。麻酔の深度モニターは、麻酔科医にとって望まれているモニターである。特に、術中覚醒は患者に大きな苦痛を与えること

になる。なかでも静脈麻酔による術中覚醒は大きな問題で、これを防止するためにも、麻酔深度モニターの開発、改良が求められている。近年、種々の心拍出量モニターが開発されており、それぞれ侵襲度、精度、得意・不得意に差がある。圧をモニターして循環動態を推測していた時代から、容量や拍出量を実測して麻酔管理を行う時代に突入してきたといえる。

患者の安全を守り、麻酔の質を向上することは、薬剤の開発やモニターの改良だけでは達成できない。医療が医

師と患者の信頼関係で成り立つように、麻酔も麻酔科医と術者と患者との関係が重要な役割を果たしており、良質な麻酔を提供するためには、麻酔科医の果たす役割は大きいと考える。

麻酔の質の向上は、薬剤、医療機器とモニターの開発・改良と、質のよい麻酔科医に加えて、関連各科の医師、看護師、薬剤師、ME(臨床工学技師)などの知識と理解があって、はじめて可能となる。本稿がそのために役立つことを願うものである。

与法の果たす役割

Patient Controlled Analgesia (PCA：患者自己管理鎮痛法)

慶應義塾大学麻酔学教室 橋口さおり，武田 純三

KEY WORDS

- PCA
- オピオイド
- 鎮痛薬

I. PCAの原理

鎮痛薬にはオピオイドと非ステロイド性消炎鎮痛薬の2種類があるが，癌性疼痛や術後痛管理において中心的役割を果たすのはオピオイドで，投与経路は経口，経直腸，皮下，静注，硬膜外，くも膜下投与などが可能である。鎮痛薬投与は医療施設外でも患者自身が使用しやすい経口や経直腸投与などの簡便な方法が望ましいが，なんらかの理由で不可能な患者に対しては，従来看護師でも施行しやすい間欠的筋注がよく用いられてきた。筋注は作用発現が遅く血中濃度の調節が難しいうえに，疼痛がある患者にさらに疼痛を伴う処置が必要になるため，投与経路として適切なものとはいえない。これに代わる方法として考えられたのが比較的少量の鎮痛薬を頻回に静注する方法であり，これを有効に，しかも省力化して行うために考案されたのがPCA (Patient Controlled Analgesia：患者自己管理鎮痛法)である。PCAは，疼痛

の状況にあわせて患者自身がボタンを押すことで鎮痛薬の投与を施行する，いわゆる鎮痛薬のオンデマンド投与方法で，PCA用の機器を使用する。図1にPCAによる条件付けの図を示す。条件付け(疼痛)に対する条件反応(ボタンを押すこと)が報酬(疼痛緩和)によって強化されることによってループが完成する。したがって，疼痛が存在する限りボタンを押す頻度は増加するが，疼痛が減少するに従って頻度は低下し，疼痛の強度に応じた鎮痛が図られることになる。このサイクルで問題になることは，サイクルがさまざまな因子の影響を受けることである。たとえば，鎮痛薬の副作用や鎮痛薬に対する恐怖はボタンを押す行為に対して抑制的に作用する。また必要以上に長いロックアウト時間や少なすぎるボーラス量は，報酬としての疼痛緩和を十分に保証しないため，患者の「ボタンを押す」行動を生じさせない可能性がある。ボーラス回数が少ないことが必ずしも良好な疼痛緩和を反映しているとは限らない

Patient Controlled Analgesia
ori Hashiguchi(講師)
Tzou Fakeda(教授)

ことは注意が必要である。また、有効に使用するためには、患者自身がボタンを押す行動が必要であることを事前に十分理解させることも重要となる。

II. MEACとMCP

疼痛の軽減のために必要な鎮痛薬の最低限の血中濃度のことをMEAC (minimum effective analgesic concen-

tration)といい、疼痛を感じる鎮痛薬の最大の血中濃度をMCP (maximum concentration with pain) という。MEACは個体差が大きく、疼痛を緩和するために必要な鎮痛薬の量にはかなりの差がある。上腹部手術後に静注PCAを利用してモルヒネを投与した研究では、モルヒネの必要量は10倍の差があった¹⁾。一方、MEACとMCPの差については個体差は少ないと考えられ

ている。術後痛において適切なボラス投与量を決める研究では、1 mg/回が最も効果があるとの結果であった²⁾。つまり、モルヒネ静注では、MEAC-MCPは1 mg/回の投与で充足されるということである。PCAの元々の考え方は、まずは医療者の手でローディングを行い、鎮痛薬の血中濃度をMEACまで引き上げておき、血中濃度が下がるとMCPに到達して疼痛を感じるため、患者がボラスボタンを使用して血中濃度をMEACまで引き上げる行為といえる(図2)。

III. PCAの設定項目

PCAは患者にあわせていくつかの項目を設定することで、患者自身の手による鎮痛薬の投与が可能となる。設定する項目は主に3つである。

①持続投与量：1時間あたりに投与される薬液量のことである。鎮痛効果を発揮する最低限の血中濃度を確保する意味をもつが、過剰となった場合には副作用を生じる危険も併せもつ。モルヒネのように、作用時間が長いものでは持続投与量を設定せずにボラス投与のみで維持することも可能であるが、フェンタニルのように作用時間が短い薬物や、硬膜外投与のように作用発現までに時間がかかる場合には、持続投与量を設定する必要がある。

②ボラス投与量：患者がボタンを押すことによって投与される1回量であり、基本的には患者の最小有効投与量に基づいて決定される。患者がPCAを効果的に使用するためには、患者が効果を実感できる投与量を設定する必要がある。ボタンを押す行為で満足するというプラセボ効果はない。

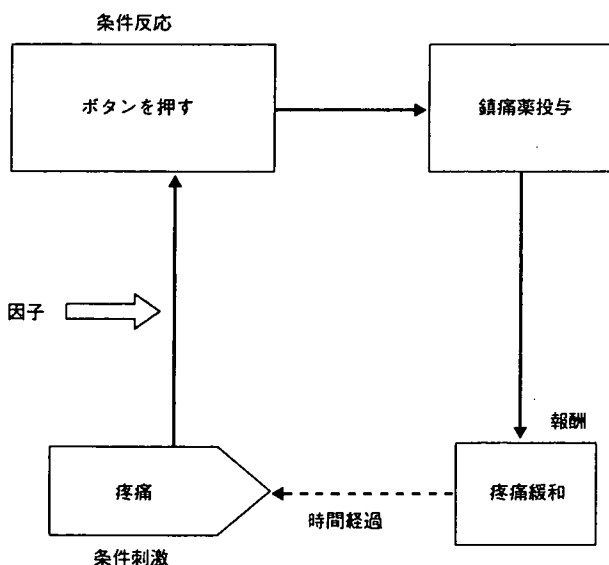


図1. PCAによる条件付けループ

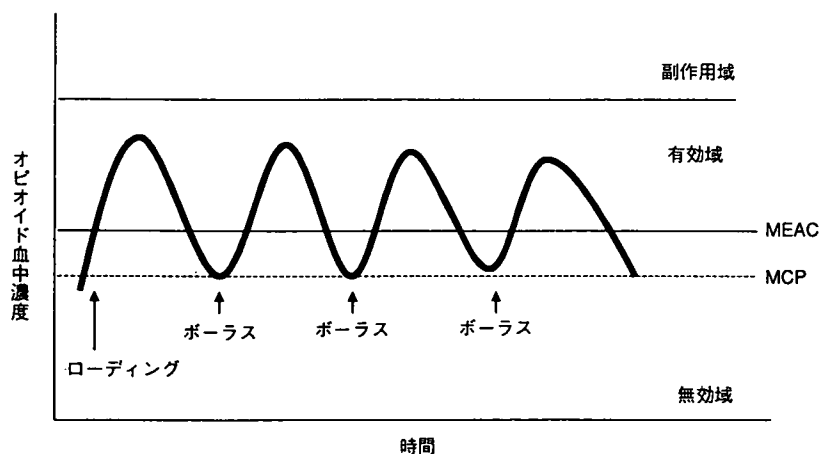


図2. 鎮痛薬血中濃度

③ロックアウト時間：患者によるボラス投与が行われてから、次のリクエストが有効になるまでの時間間隔である。ロックアウト時間内のリクエストは無視され、この間にボタンを押してもボラスは無効となる。過剰投与を避けることを目的としている。

オピオイドを投与する場合、血中濃度は効果の指標とはならない。オピオイドの効果器官は中枢神経系(CNS)であり、血中濃度の上昇とCNSにおける濃度には時間差(effect delay)が生じる。血中濃度の変化は早いですが、CNS濃度はそれよりもゆっくりと変化する。CNSにおけるオピオイドの最大濃度の80%程度で効果を発現するといわれている。80%に達するまでの時間がrelative onsetで、80%以上のCNS濃度が維持されている時間をrelative durationという(図3)。オピオイドのCNS濃度のプロフィールがPCAの設定の参考になる³⁾(表)。ロックアウト時間の設定にあたっては、relative onsetの時間が基準になっている。たとえばモルヒネ静注の場合、relative onsetが6分であるため、ロックアウト時間は10分前後に設定する。フェンタニルは作用発現までの時間がモルヒネよりも早い2分であるため、短めの5分程度でよい。無意味に長い時間の設定は、患者にとって疼痛に耐える時間を長引かせるだけであり、慎むべきである。

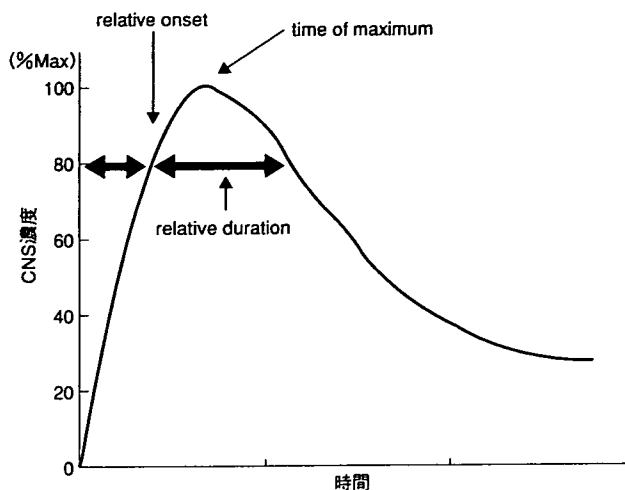


図3. CNS濃度

表. オピオイドのCNS濃度プロフィール

	relative onset (分)	t max (分)	relative duration (分)
単回静注			
モルヒネ	6	19	96
ペチジン	6	13	20
フェンタニル	2	4	7
アルフェンタニル	1	2	2
単回筋注			
モルヒネ	20	48	110
ペチジン	17	30	39
単回経口			
モルヒネ	37	82	139

IV. PCAを使用する メリット、デメリット

PCAの利点は、①疼痛時に医療者を呼ぶ必要がないため、疼痛を感じている時間を短縮できる、②食事や歩行など活動にあわせて効果的に使用できる、

- ③投与時に筋注を施行するなど新たに疼痛を伴うような処置が必要ない、
- ④患者が自ら対処する方法を得ることで主体性を尊重できる、などがあげられる。一方、欠点としては、①特別な機械が必要、②医療関係者が機械の取り扱いに習熟していかなくてはならないため、導入に時間と労力がかかる、③事前に患者への説明が必要、④副作用の発生に速やかに対処するための管理体制を整えることが必要、⑤機器や副作用などあらゆるトラブルに対処できるスーパーバイザーが必要、などである。

V. 機器

PCAを施行するためには、PCA用の機器が必要となる。本邦ではディスプレイバルーン型ポンプと電動式ポンプの入手が可能である。電動式PCAポンプは個々の患者の条件に応じて随時調節できることが最大の利点であり、術後痛や癌性疼痛管理や無痛分娩などに広く利用されている。当院で使用している電動式PCAポンプを示す(アイフューザー[®], IMS社製, 図4)。ディスプレイポンプは簡単に使用

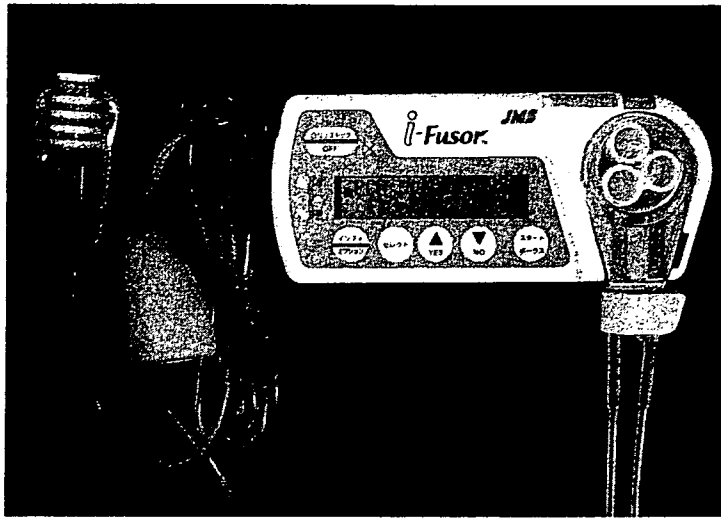


図4. 電動式PCAポンプ

でき、電動式と比較すると軽く、もち運びに便利であることから、多くの施設で使用されているが、アラームがないこと、履歴が残らないことなどが欠点となる。

VI. 副作用対策, 安全管理

PCAを安全に使用するためには、副作用を早期に発見し、対処することが

重要である。副作用を的確にとらえ、それに対する処置がわかりやすいように、副作用をスコア化して記録し、異常がみられた場合の処置をマニュアル化しておく方法が有用である。また、多くの機器を安全に管理するために、多職種による疼痛管理サービス (acute pain service) を整備することが望ましい⁴⁾。

おわりに

疼痛は個人差が大きく、画一的な対処では十分に緩和することはできない。PCAは、変動が大きい疼痛に柔軟に対応できるため、強力なツールとなる。マンパワー不足が問題となっている本邦の医療現場でも、工夫次第で効率的かつ安全な運用は可能である。今後、多くの患者がこの方法による恩恵を享受できるよう望むものである。

文 献

- 1) Bennett RL, Batenhorst RL, Bivens BA, et al : Patient controlled analgesia : a new concept of pain relief. *Annals of Surgery* 195 : 700-704, 1982
- 2) Owen H, Kluger MT, Plummer JL : Variables of patient controlled analgesia 4 : the relevance of bolus dose size to supplement a background infusion. *Anaesthesia* 45 : 619-622, 1990
- 3) Upton RN, Semple TJ, Macintyre PE : Pharmacokinetic optimization of opioid treatment in acute pain therapy. *Clin Pharmacokinet* 33 : 225-244, 1997
- 4) 橋口さおり, 大西 幸, 小杉志都子, 他 : PCAポンプを使用した術後痛管理システム. *ペインクリニック* 26 : 834-841, 2005

Systemic Administration of Hemoglobin Vesicle Elevates Tumor Tissue Oxygen Tension and Modifies Tumor Response to Irradiation

Manabu Yamamoto, M.D.,* Yotaro Izumi, M.D., Ph.D.,*¹ Hirohisa Horinouchi, M.D., Ph.D.,*
Yuji Teramura, Ph.D.,§ Hiromi Sakai, Ph.D.,§ Mitsutomo Kohno, M.D., Ph.D.,*
Masazumi Watanabe, M.D., Ph.D.,* Masafumi Kawamura, M.D., Ph.D.,* Takeshi Adachi, M.D., Ph.D.,†
Eiji Ikeda, M.D., Ph.D.,‡ Shinji Takeoka, Ph.D.,§² Eishun Tsuchida, Ph.D.,§
and Koichi Kobayashi, M.D., Ph.D.*

*Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery; †Department of Biochemistry and Integrative Medical Biology;
‡Department of Pathology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan; and §Research Institute for Science and Engineering,
Waseda University, Tokyo, Japan

Submitted for publication September 22, 2007

Background. We have developed a phospholipid liposome vesicle encapsulating concentrated human hemoglobin (hemoglobin vesicle, HbV) as an artificial oxygen carrier, as an alternative to red cell transfusion. We have verified its oxygen transporting capability in a variety of preclinical models. Recent evidence suggests that artificial oxygen carriers may also be applicable for better oxygenation of ischemic or hypoxic tissues including tumors. To our knowledge, tumor oxygenation using a liposome-type artificial oxygen carrier has not been closely tested. In the present study, we tested whether systemic HbV administration changes tumor tissue oxygen tension, and if it modifies tumor response to irradiation.

Materials and methods. Lewis lung carcinoma was grown subcutaneously in the left hindleg of C57BL/6 mice. Experiments were initiated when the tumors reached approximately 8 mm. All experiments were done under room air. Tumor tissue oxygen tension was measured by phosphorescence quenching up to 45 min after systemic sample administration (saline: $n = 5$; HbV: $n = 5$; HbV containing methemoglobin (metHbV): $n = 4$; HbV with high oxygen affinity (lowP50HbV): $n = 8$) and compared between samples. To test the effects on irradiation response, samples (saline: $n = 7$; HbV: $n = 7$; metHbV: $n = 7$; lowP50HbV:

$n = 7$) were administered prior to single 20-Gy irradiation, and tumor growth was compared.

Results. Tumor tissue oxygen tension transiently increased approximately 2-fold after HbV administration in comparison to other samples. Tumor growth was marginally delayed after irradiation by prior administration of HbV in comparison to other samples. HbV administration without irradiation did not affect significant tumor growth delay.

Conclusions. These results correlatively suggest that HbV augmented tumor growth delay following irradiation, at least in part, by affecting tumor tissue oxygen tension. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key Words: hemoglobin vesicle; artificial oxygen carrier; tumor oxygenation; radiosensitizer; liposome; HIF1alpha.

INTRODUCTION

Artificial oxygen carriers are currently being actively developed for use as transfusion alternatives. Artificial oxygen carriers do not have blood types, are free of potential infectious pathogens, and can be stored much longer than red blood cells (RBCs) [1]. Several preclinical studies indicate that they can be effectively applied as temporal resuscitative fluids, and some are undergoing clinical trials [2, 3].

Hemoglobin (Hb)-based oxygen carriers are classified into acellular chemically modified Hbs and encapsulated Hbs [4, 5]. We have developed a phospholipid liposome vesicle encapsulating concentrated human hemoglobin (hemoglobin vesicle, HbV) as an artificial oxygen carrier [1]. The cellular structure of HbV has characteristics that

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery, School of Medicine Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan. E-mail: yotaro@sc.itc.keio.ac.jp.

² Current affiliation: Consolidated Research Institute for Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan.



resemble those of RBCs. It has lipid bilayer membranes that prevent the direct contact of hemoglobin with blood components and the endothelial lining, thus shielding the side effects of molecular hemoglobin [6, 7]. HbV particles are eventually captured by the phagocytes in the reticuloendothelial system and are metabolized through existing physiological pathways [8–10]. We have studied the oxygen transporting capabilities of HbV using several exchange transfusions, and hemorrhagic shock animal models [11–15]. In these studies, we have shown that HbV effectively restores the systemic circulation similar to red cell transfusion. Recently, evidence is accumulating that artificial oxygen carriers may be potentially applicable as so-called oxygen therapeutics, which enable oxygenation of ischemic tissues [16, 17]. Increasing tumor tissue oxygen tension is one such possibility. In the present study, we show that systemic administration of HbV transiently increases tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Hemoglobin Vesicles

Preparation of poly(ethylene glycol) modified HbV was performed at Waseda University under sterile conditions as previously reported [18–20]. Hemoglobin was purified from outdated donated blood provided by Japanese Red Cross Society (Tokyo, Japan). The encapsulated hemoglobin (38 g/dL) contained 14.7 mmol/L of pyridoxal 5'-phosphate (PLP; Sigma, St. Louis, MO) as an allosteric effector at a molar ratio of Hb/PLP = 2.5. The lipid bilayer was composed of a mixture of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine, cholesterol, and 1,5-bis-*O*-hexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate at a molar ratio of 5/5/1 (Nippon Fine Chemicals, Osaka, Japan) and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-poly(ethylene glycol) (NOF Corp., Tokyo, Japan; 0.3 mol% of the total lipid). HbV was suspended in saline at the Hb concentration of 10 g/dL. The physicochemical parameters of the HbV were as follows: particle diameter, 251 ± 80 nm; methemoglobin concentration, <1%; HbCO concentration, <2%; and oxygen affinity (P_{50}), 29 Torr.

Preparation of Methemoglobin Vesicles

Methemoglobin vesicles (metHbV) were formed by oxidation of hemoglobin contained within HbV (methemoglobin formation), using the oxidative properties of nitrosylhemoglobin [21]. Nitric oxide gas was infused into the deoxygenated HbV suspension to transform hemoglobin to nitrosylhemoglobin. After infusion of nitrogen gas to expel the excess nitric oxide, oxygen was infused to convert nitrosyl-hemoglobin to methemoglobin, yielding metHbV. Vesicle properties were considered to be equivalent to HbV except for its lack of oxygen transporting ability.

Preparation of Low P₅₀ Hemoglobin Vesicles

HbV with P_{50} of approximately 8 Torr (lowP50HbV) was prepared in the same way as HbV except that pyridoxal 5'-phosphate was not added. Particle diameter was controlled to 250 ± 64 nm. Vesicle properties were considered to be equivalent to HbV except for its P_{50} .

Animal and Tumor

Male C57BL/6 mice, approximately 9 weeks old, weighing 21 to 25 g (Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) were used for the experi-

ment. The animals were housed five per cage in a specific pathogen-free, temperature-controlled, 12-h light/dark-cycled room with free access to food and water. For the experiments, the animals were anesthetized with intramuscular injection of a cocktail of 90 mg ketamine hydrochloride (Parke-Davis, Morris Plains, NJ) and 9 mg xylazine (Fermentia, Kansas City, MO) per kilogram body weight.

Lewis lung carcinoma cell line (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Tokyo, Japan) was used for this study. In a separate group of donor mice, the tumors were grown subcutaneously and passaged. Under anesthesia, an approximately 1-mm-diameter tumor fragment was taken from the donor mouse and was placed subcutaneously in the left hindleg of mice in the experiment groups. Experiments were initiated 10 days after tumor implantation, at which time the tumors reached approximately 8 mm in diameter.

For material administration, the tail vein was cannulated under anesthesia by a 30-gauge needle and the needle was fixed by a cyanoacrylate adhesive. All experiments were carried out under room air.

All experimental protocols were reviewed by the Committee on the Ethics of Animal Experiments at School of Medicine, Keio University, and were carried out in accordance with Guidelines for Animal Experiments issued by the School of Medicine Keio University Experimental Animal Center and The Law (No. 105) and Notification (No. 6) issued by the Japanese Government. These guidelines meet the guidelines for animal handling issued by the National Institutes of Health (NIH).

Tumor Tissue Oxygen Tension Measurements

The tumor tissue oxygen tension was measured by the oxygen-dependent quenching of phosphorescence using Oxyspot phosphorimeter systems (Medical Systems Corp., Greenvale, NY). The skin over the tumor was carefully removed, and a glass coverslip was placed over the tumor. The skin on the back was also carefully removed and the back muscle was exposed followed by coverslip placement. Saline was injected under the coverslip to sustain moisture. The porphyrin probe (Oxygen Probe; Harvard Apparatus, Holliston, MA), 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxylphenyl)porphyrinatoparadiam, was provided as a lyophilized powder containing 9% probe, 80% bovine serum albumin (clinical grade, low fatty acid), 3% Trisma buffer, and 8% NaCl. It was dissolved in distilled water (pH 7.4) and administered through the tail vein (0.9 mL/kg). Approximately 5 min after probe administration, oxygen tension measurement was initiated. The light from the flash-lamp was filtered through an interference filter with 545-nm center wavelength and half-bandwidth of 45 nm. It was conducted through the light guide and focused on an approximately 8-mm-diameter area of the tumor tissue, approximately 4 mm from the tumor surface. The phosphorescence collected by the lens was introduced into the light guide and was filtered through a long pass filter at 645 nm, which was then led into the photomultiplier. The phosphorescence decay was fitted to a single exponential to determine the lifetime and oxygen partial pressure using the Stern-Volmer equation [22].

Measurements were made three times and averaged for each time point. Back skeletal muscle tissue oxygen tension was measured before and after tumor tissue oxygen tension measurements as control values. Tumor tissue oxygen tension was measured before (time 0), 1, 2, and 3 min after sample administration, and every 3 min thereafter until 45 min. Samples (saline: saline group, $n = 5$; HbV: HbV group, $n = 5$; metHbV: metHbV group, $n = 4$; lowP50HbV: lowP50HbV group, $n = 8$) were administered through the tail vein, 12 mL/kg, in approximately 1 min.

Tumor Growth Measurements

Tumor growth measurements were made after sample administration followed by irradiation (saline: salinerad group, $n = 7$; HbV: HbVrad group, $n = 7$; metHbV: metHbVrad group, $n = 7$; lowP50HbV: lowP50HbVrad group, $n = 7$) or without irradiation (saline: salinenon-

rad group, $n = 5$; HbV: HbVnonrad group, $n = 4$). Single-dose irradiation (20 Gy) was delivered to the tumor-bearing mice using a device designed for mouse bone marrow irradiation (Hitachi Medicotecology, MBR-1520R-3, Hitachi, Japan). To irradiate only the tumor-bearing left hindlimb, a cage that shields the whole body except the tumor area from irradiation was used (Hitachi Medicotecology, MBR-1520R-3). Power output of X-ray irradiation was 150 Kv, 20 mAmp. A 0.5-mm aluminum filter was used to filtrate forward-scattered radiation. Before mouse placement, a dose measurement probe was placed inside the shield cage at the assigned tumor site, and test irradiation was done to determine the dose rate at the tumor location. Next, the probe was placed in an allocated position outside the cage, and test irradiation was done. From these two test dose rates, the dosage at the tumor site was automatically calculated in proportion to the dosage at the measurement probe. The dose rate at the tumor site was approximately 2.2 to 2.4 Gy per minute. It took approximately 8 min to complete 20-Gy irradiation using this device. Based on the measurements in tumor tissue oxygen tension following HbV administration, samples were administered approximately 10 min before the start of irradiation (salinerad, HbVrad, metHbVrad, lowP50HbVrad groups). Additionally, saline and HbV were administered without irradiation (salinenonrad, HbVnonrad groups). After sample administration with or without irradiation, the tail vein needle was removed, and the animals were allowed to recover from anesthesia. Tumors were measured using a venier caliper every 2 days up to 28 days after tumor implantation, after which point some animals started to show tumor-related distress. Estimated tumor weight was calculated as previously described [23]:

$$\begin{aligned} & \text{Estimated tumor weight (mg)} \\ &= \text{longer tumor diameter (mm)} \\ & \times [\text{shorter tumor diameter (mm)}]^2 / 2. \end{aligned}$$

Histological Studies and Hypoxia-Inducible Factor-1-alpha Analysis

In a separate group of animals, tumors were resected 20 min after intravenous administration of HbV ($n = 4$) or metHbV ($n = 4$). Half the tumor was fixed in 10% formalin for histology. The other half was immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Paraffin sections were prepared from fixed tumor specimens and stained with hematoxylin and eosin for morphology. To locate HbV in tumor tissue, the human hemoglobin contained in the HbV was stained as previously described [8], with a rabbit polyclonal antibody against human hemoglobin (DAKO A/S, Copenhagen, Denmark) as the primary antibody. This antibody did not cross-react with mouse hemoglobin, which was evident from the fact that mouse RBCs were not stained. Reaction with the secondary antibody and color development were performed with the Ventana alkaline phosphatase RED detection kit using the Ventana NX system (Ventana Med. System, Inc., Tucson, AZ).

Western analysis for HIF1alpha protein was performed with the standard method. Briefly, cells were lysed with a denaturing buffer, and the lysate was centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4°C . The supernatant was mixed with Laemmli buffer and applied to SDS-PAGE gels. The proteins were separated by 10% SDS-PAGE and then transferred to PVDF membrane for 90 min at 90 V using Novex Tris-Glycine system (Invitrogen, Carlsbad, CA). The primary antibody for HIF1alpha (clone 54; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) was incubated with the blot overnight. The secondary anti-mouse IgG was incubated with the blots for 1 h. Bands were detected by enhanced chemiluminescence using Super Signal substrate (Pierce, Rockford, IL). Band densitometry was quantified using Image J (NIH, Bethesda, MA).

Data Analysis

Data are shown as mean \pm standard deviation. Changes in tumor tissue oxygen tension and tumor growth measurements with or

without irradiation were compared by analysis of variance followed by Scheffé's post-hoc test (StatView; Abacus, Berkeley, CA). Differences between groups at particular time points were compared by Mann-Whitney t -test (StatView; Abacus). Band densitometry was compared by Mann-Whitney t -test (StatView; Abacus). P values smaller than 5% were considered significant.

RESULTS

Sample administration and irradiation were well tolerated in all of the animals with no apparent changes in behavior or feeding.

Tumor Tissue Oxygen Tension Measurements

The tissue oxygen tension of back muscle before (saline: 14.4 ± 1.2 ; HbV: 14.2 ± 1.6 ; metHbV: 15.3 ± 1.2 ; lowP50HbV: 14.8 ± 1.2 (Torr)) and after (saline: 14.5 ± 1.1 ; HbV: 14.3 ± 1.4 ; metHbV: 15.3 ± 1.0 ; lowP50HbV: 14.6 ± 1.3 (Torr)) sample administration did not change significantly within or between groups. There were no significant differences in tumor tissue oxygen tension before sample administration (saline: 4.1 ± 1.1 ; HbV: 4.3 ± 0.8 ; metHbV: 4.3 ± 1.1 ; lowP50HbV: 4.3 ± 1.1 (Torr)). After sample administration, tumor tissue oxygen tension increased transiently in the HbV group during the observation period. Differences became significant from 15 to 30 min after sample administration in comparison to other groups. There was also a slight transient increase in the tumor tissue oxygen tension in the lowP50HbV group. Difference was significant between the saline group at 12 and 15 min after sample administration. Multiple comparisons using analysis of variance showed significant differences between HbV group curve and other groups. There was also a significant difference between lowP50HbV group curve and saline group curve (Fig. 1).

Tumor Growth Measurements

There were no significant differences in estimated tumor weight between groups at day 10 before sample administration, with or without irradiation (salinerad: 252 ± 27 ; HbVrad: 248 ± 38 ; metHbVrad: 239 ± 43 ; lowP50HbVrad: 248 ± 38 ; salinenonrad: 250 ± 33 ; HbVnonrad: 249 ± 38 (mg)). HbV administration without irradiation (HbVnonrad group) did not affect significant tumor growth delay in comparison to saline administration without irradiation (salinenonrad group). In both of these nonirradiated groups, tumor growth was significantly faster in comparison to any of the irradiated groups. Tumor growth delay after irradiation was marginally greater in the HbVrad group in comparison to other groups. Differences reached significance in the HbVrad group after irradiation in comparison to all other groups, from 16 to 28 days, except at day 24, at which point the difference was not significant between the metHbVrad group. Multiple comparisons

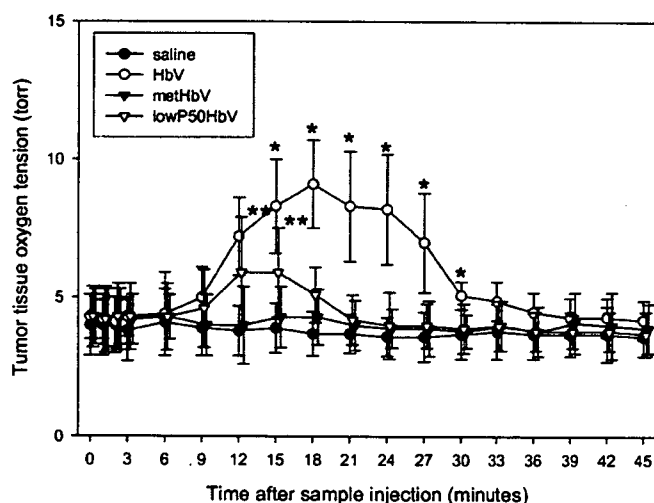


FIG. 1. Tumor tissue oxygen tension increased transiently in the HbV group. Differences became significant from 15 to 30 min after sample administration ($*P < 0.05$ versus all other groups, Mann-Whitney *t*-test). There was also a transient increase in the tumor tissue oxygen tension in the lowP50HbV group. Difference was significant between the saline group at 12 and 15 min after sample administration ($**P < 0.05$ versus saline group, Mann-Whitney *t*-test). Multiple comparisons using analysis of variance showed significant differences between the curves of HbV group and other groups. There was also a significant difference between the curves of lowP50HbV group, and saline group.

using analysis of variance showed significant differences between HbVrad group curve and all other groups (Fig. 2).

On hematoxylin and eosin staining, the tumors at day 10 were morphologically composed primarily of tumor cells, and tumor vessels, with very little extracellular matrix. Human hemoglobin staining revealed the presence of stained material not only within the tumor vessel (Fig. 3A) but also in the extracellular matrix (Fig. 3B), which were presumably extravasated HbV. On Western blot analysis, HIF1alpha level was significantly decreased in the HbV group in comparison to the metHbV group (Fig. 4).

DISCUSSION

One of the primary causes of tumor resistance to irradiation may be tumor tissue hypoxia. Although still far from conclusive in the clinic, this notion is generally accepted [24]. *In vitro* studies show that the presence of oxygen increases the cytotoxicity of irradiation, resulting in roughly a 3-fold difference in radiosensitivity between hypoxic and aerobic cells [25, 26]. This phenomenon is widely attributed to the oxygen's ability to chemically modify radiation-induced DNA damage, creating adducts that are not repaired by cells.

A correlation between tumor tissue oxygen tension status and therapeutic response after treatment with irradiation or chemotherapeutic agents has been observed in

many preclinical studies. There is also accumulating clinical evidence that therapeutically significant tissue hypoxia frequently exists in human tumors. As a result, there has been a longstanding active research into novel methods of improving tumor tissue oxygenation, targeting hypoxic tumor cells, and/or modulating the effect hypoxia has on how tumors respond to treatment. Several methods of overcoming tumor tissue hypoxia are currently under investigation. These include hyperbaric oxygen, hyperthermia, and the use of potential radiosensitizers such as nitroimidazole-based substances, and pentoxifylline [27]. Artificial oxygen carriers, such as perfluorochemicals, and modified hemoglobins have also been evaluated for this purpose in several preclinical studies [28–34]. We have previously reported the effect of a totally synthetic-heme-based artificial oxygen carrier in oxygenating tumor tissue [35]. To our knowledge, tumor oxygenation using a liposome-type artificial oxygen carrier has not been closely tested.

The dose of HbV administered in this study, 12 mL/kg, is rather high in the context of a therapeutic drug. But since HbV is being developed primarily as a transfusion alternative, it should be possible to administer this dosage without complications in order for HbV to be clinically applicable. No adverse effects directly attributable to material administration were apparent with any of the administered samples. Oxygen tension of back muscle tissue did not change significantly with

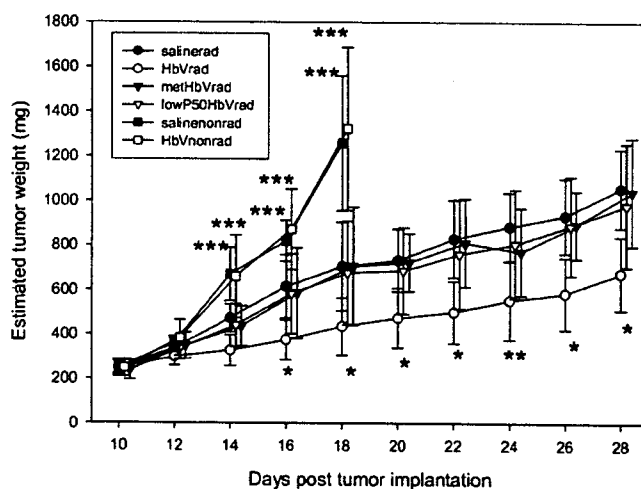


FIG. 2. Sample administration, saline, HbV, metHbV, lowP50HbV, with irradiation (salinerad, HbVrad, metHbVrad, lowP50HbVrad, groups respectively) or without irradiation (salinenonrad, HbVnonrad groups) were carried out on day 10. In the salinenonrad and HbVnonrad groups, tumor growth was significantly faster in comparison to any of the irradiated groups ($***P < 0.05$ versus groups that received irradiation, Mann-Whitney *t*-test). Tumor growth delay after irradiation was significantly increased in the HbVrad group in comparison to other groups ($*P < 0.05$ versus all other groups, Mann-Whitney *t*-test), except at day 24, at which point the difference was not significant between the metHbVrad group ($**P < 0.05$ versus all other groups except metHbV group, Mann-Whitney *t*-test). Multiple comparisons using analysis of variance showed a significant difference in the growth curves between HbVrad group, and all other groups.