

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：H17-医薬-050)

平成 17～19 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告書	1 ~ 58
------------------	--------

武田 純三（慶應義塾大学医学部 教授）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	59 ~ 65
III. 研究成果の刊行物・別冊	66 ~

別添 3

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）
（総合）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

研究総括

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。

一方、人工赤血球、Hb 小胞体実際の臨床応用を考えた場合には、集中治療室(Intensive Care Unit: ICU)において合併症を併発した状態においての使用が多く想定され、正常な生体への投与とは異なった影響が考えられる。このような状況を踏まえて、本研究では先ず 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、出血性あるいは炎症性のショック（systemic inflammatory response syndrome）、膜型人工肺回路を用いた全身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。一方 ICU では、重症患者の輸液/輸血/呼吸管理のため、その容態について時宜を失すること無く観察することが必要となる。この際、大量投与される人工赤血球の存在自体が様々な測定機器および方法に干渉作用を示す場合がある。本研究では日常の検査法が支障無く使用できるよう、周辺 Medical Engineering(ME)技術の整備を試みた。具体的には血液中の Hb 小胞体を血漿から分離し、血漿を用いた生化学検査を可能にする技術、および Hb 小胞体の血中濃度の簡便な測定方法の確立を試みた。さらには Hb 小胞体の特徴でもある膜修飾の技術を生かし、例えばショック時に発生する活性酸素を除去する機能の付与、あるいは同様の生体内状況下、あるいは回路装置内などでより安定で壊れにくい小胞体の作成を試みた。

平成 17 年度

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）。本研究ではウサギにおける VILI モデルに生理食塩水に分散した人工赤血球、Hb 小胞体の投与を行った。検討した範囲では Hb 小胞体投与の VILI への影響は明らかではなかった。

②ICU 管理を要する症例の多くは単一ではなく、様々な疾患あるいは合併症を併発している。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。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と考えられている。出血ショックは 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。本研究の条件では出血ショック蘇生後のラット腸間膜リンパ節の培養は Hb 小胞体群、5% アルブミン群ともに陰性であった。培養方法などを見直すことも必要と考えられたが、加えた侵襲が少な

すぎた可能性が最も高いと考えられた。

③膜型人工肺回路への Hb 小胞体の応用を検討するため、幼若ビーグル犬を用いた人工心肺モデルの確立を試みた。全身麻酔および人工心肺装着に関して技術的に習熟する必要があった。人工心肺の還流は可能であった。還流条件の設定をさらに変更する必要があるが、Hb 小胞体を回路に充填することにより良好な組織還流が得られた。

④Hb 小胞体(粒径 250 nm)は血球に比して数十倍小さな微粒子であるため、血球の遠心分離条件で沈降させるのは実用上困難であり、Hb 小胞体の血漿あるいは血清へ浮遊は検査の障害となる。本研究では高分子凝集剤として高分子量デキストランを収容した採血管の条件設定により、Hb 小胞体投与後の採血液でも従来と同じ遠心分離法により透明な血清や血漿が得る方法を開発した。この採血管使用は、一部、リポ蛋白値で 70%程度の低値となることを除き、通常実施される血液生化学検査項目の大部分に適合した。また、Hb 小胞体中の Hb 濃度は自動血球測定装置では測定が難しいが、本研究により、沈降占有容積率は Hb 小胞体濃度に一次比例することが示され、沈降占有容積率から Hb 濃度の換算が可能であることが明らかとなった。

平成 18 年度

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、それぞれ動物モデルを用いた検討を行った。また ICU におけるモニタリングの側面では、重症患者の輸液/輸血/呼吸管理のため、その容態について時宜を失すること無く観察することが必要となる。この際、大量投与される人工赤血球の存在自体が様々な測定機器および方法に干渉作用を示す可能性が想定された。本研究では日常の検査法が支障無く使用できるよう、周辺 Medical Engineering(ME)技術の整備を試みた。具体的には血液中の Hb 小胞体を血漿から分離する技術および血液酸素飽和度測定に関する新しいアプローチを検討した。さらに ICU における病態により適した Hb 小胞体開発の一步として、小胞体脂質膜の修飾の可能性を検討した。

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)。本研究ではウサギにおける VILI モデルに人工赤血球、Hb 小胞体の投与を行った。生理食塩水分散液と 5%アルブミン分散液の両者についても比較検討を行なった。検討した範囲では Hb 小胞体投与の VILI への影響は明らかではなかった。また分散液の違いに基づく差も明らかではなかった。

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。しかし、原因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 は複数の原因により全身的に炎症反応が亢進した状態を指す。原因に関わらず 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と考えられている。出血ショックは 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。また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。本研究の条件では出血ショック蘇生後のラット腸間膜リンパ節の培養は Hb 小胞体群、5%アルブミン群ともに陰性であった。5%アルブミン群でも蘇生が十分であった可能性があり、また培養方法などを見直すことも必要と考えられた。さらに大きな侵襲を安定的に加えるモデルの検討が必要と考えられた。

③膜型人工肺回路への Hb 小胞体の応用を検討するため、特に小児における灌流液としての使用を念頭においた実験モデルの作成を試みた。幼若ビーグル犬を用いた人工心肺モデルに引き続きラットにおけるモデル作成を試みた。小児人工心肺手術においては、術後の慢性期における精神発達障害が懸念されており、この理由の一つとして人工心肺中の脳血流障害が考えられる。本年度はラット人工心肺装着に関して技術的に習熟するとともに、ラットにおいて、ヘパリン投与下でも安全に行える非侵襲的脳血流のモニタリング方法を工夫した。

④Hb 小胞体(粒径 250 nm)は血球に比して数十倍小さな微粒子であるため、血球の遠心分離条件で沈降させるのは実用上困難であり、Hb 小胞体の血漿あるいは血清へ浮遊は検査の障害となる。昨年度は高分子凝集剤として高分子量デキストランを収容した採血管の条件設定により、Hb 小胞体投与後の採血液でも従来と同じ遠心分離法により透明な血清や血漿を得る方法を開発した。これに加え、本年度は限外濾過を用いた分離方法を検討した。ポリエーテルスルホン製のフィルタが最適と考えられ、約 8 割程度の回収が可能であった。また、Hb 小胞体は現行の酸素飽和度測定用パルスオキシメーターに対しては光学的干渉作用を有し、酸素飽和度は過小評価されることがわかった。4 波長光学システムは、酸素飽和度と MetHb を計測でき、HbV によるパルスオキシメーターへの干渉作用の緩和、および MetHb 濃度の計測に有効であった。敗血症を想定した小胞体脂質膜の修飾の可能性については、脂溶性抗酸化剤をリン脂質二分子膜に担持させることにより酸化障害を抑制する傾向が得られた。

平成 19 年度

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的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 外科 助教

饗庭 了 慶應義塾大学医学部 外科 講師

宗 慶太郎 早稲田大学 理工研 准教授

研究協力者

森崎 浩 慶應義塾大学医学部 麻酔科 准教授

小河 アイリーン尚美 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

長田 大雅 慶應義塾大学医学部 麻酔科 助教

小林 紘一 慶應義塾大学医学部 外科 教授

堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部 外科 准教授

渡辺 真純 慶應義塾大学医学部 外科 講師

河野 光智 慶應義塾大学医学部 外科 助教

山本 学 慶應義塾大学医学部 外科 助教

池田 達彦 慶應義塾大学医学部 外科 助教

山崎 真敬 慶應義塾大学医学部 外科 助教

保土田 健太郎 慶應義塾大学医学部 外科 助教

酒井 宏水 早稲田大学 理工学研究所 准教授

土田 英俊 早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員（早稲田大学 名誉教授）

武岡 真司 早稲田大学 理工学研究所 教授

①平成 17 年度

A. 研究目的

集中管理室(Intensive Care Unit: ICU)において治療を受ける対象となる場合、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領域で炎症反応を惹起して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、人工呼吸器管理自体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。本研究では人工呼吸器管理下に人工赤血球を投与した際の肺への影響を検討した。特に VILI が増悪するか否かを中心に検討した。

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、筋弛緩薬パントロニウム 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 にてパント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 30 %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 of 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 pCO₂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 (HbV) 生理食塩水分散液と生理食塩水(生食群)を用いた。両群の比較を行った。データは平均値±標準偏差で表した。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

ヘマトクリットは HbV 群では交換前 $52 \pm 11\%$ から交換後 $35 \pm 8\%$ 、生食群では交換前 $49 \pm 9\%$ から交換後 $35 \pm 8\%$ へ低下した (図 1)。

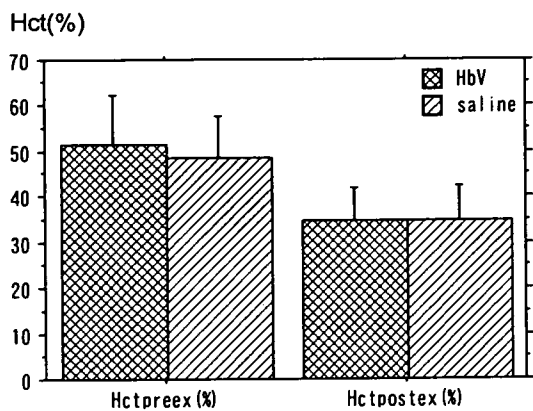


図1 Hct(%)

両群間に有意差は無く、両群ともに循環血液量の約 30% が実際に交換されたと考えられた。平均体血圧は時間とともに徐々に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)。また両群間に明らかな差は見られなかった (図 2)。

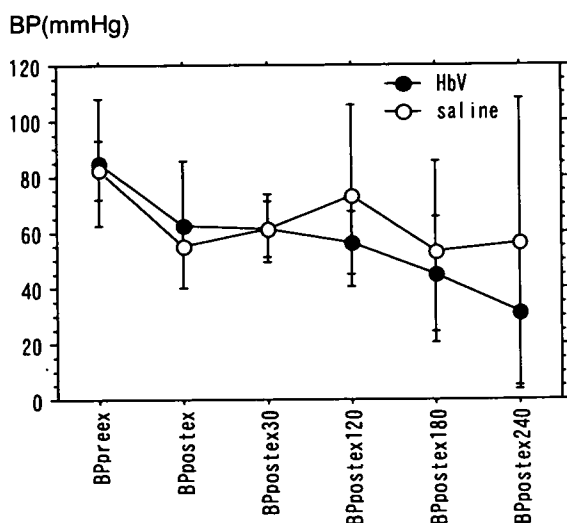


図2 BP(mmHg)

生理食塩水に分散した試料であるため、血液希釈が起こり、その結果循環血液量が若干低下したた

め、血圧の低下につながったと考えられた。動脈血酸素分圧は時間経過とともに両群で低下した (preex: 脱血交換前、postex: 脱血交換後)。HbV 群では若干低下が緩やかであったが、有意差は無かった (図 3)。

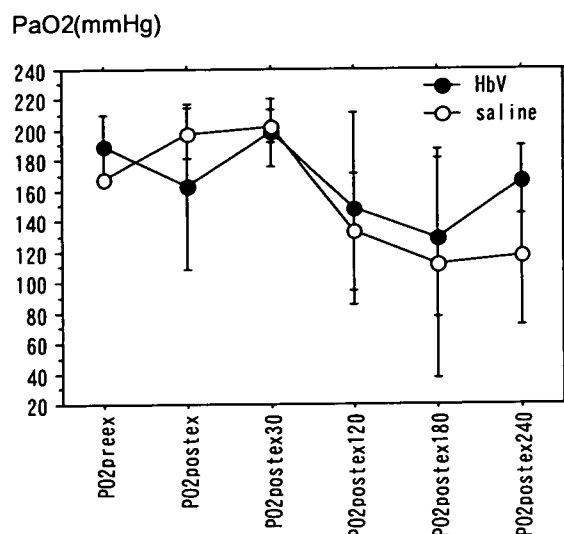


図3 PaO2(mmHg)

湿乾重量比は両群ともに正常肺と比べ上昇していた。両群間に有意差は見られなかった (図 4)。

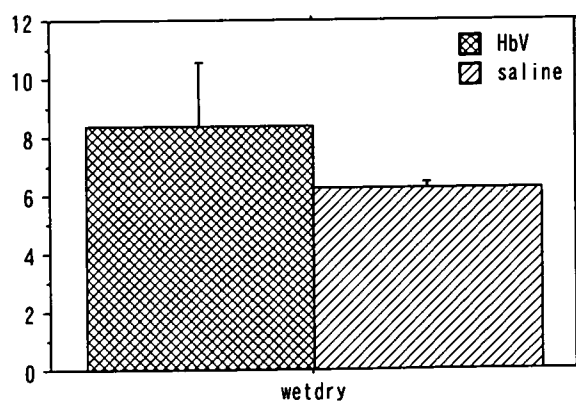


図4 湿乾重量比

切除肺においては両群で軽度の肺水腫が見られた。VILI の発生原因は未だ明らかではない。陽圧換気による肺胞の非生理的進展がきっかけになると考えられるが、その後白血球の活性化、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た。生理食塩水投与との比較を行った。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。

D. 結論

人工赤血球を ICU で使用する場合、高頻度に合併する可能性がある 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、人工赤血球投与の影響は明らかではなかった。しかし実際の臨床では VILI のレベルは多岐にわたると考えられ、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。

①平成 18 年度

A. 研究目的

集中管理室(Intensive Care Unit: ICU)において治療を受ける対象となる場合、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り、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領域で炎症反応を惹起して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、人工呼吸器管理自体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。本研究では人工呼吸器管理下に人工赤血球を投与した際の肺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。また 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もあわせて検討した。

C. 研究方法

動物種：雄、日本白色家兎 (2.0~2.5 kg)。

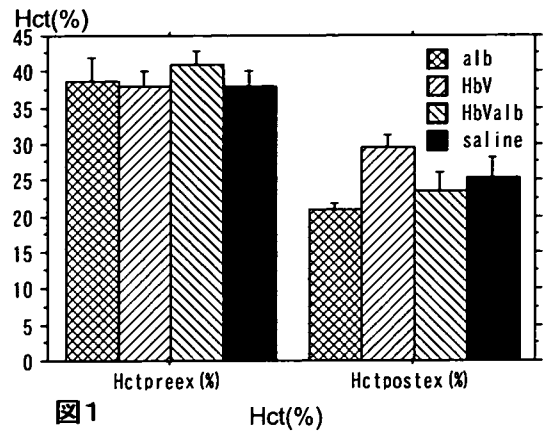
実験操作：麻酔導入薬としてケタミン 100 mg を筋注。鎮静が得られた後耳静脈を確保した。耳静脈より鎮静薬 0.5 %ペントバルビタール 4 ml/kg/hr の投与を開始した。頸部に枕木をあて、仰向けに固定した。頸部および胸部腹側を剃毛した後消毒を行った。頸部に局所麻酔薬 0.5 %リドカイン 3 ml を皮下投与した。頸部に皮切を加え気管切開を施行し、気管周囲を剥離した。気管近傍の内頸動脈を露出し、内頸動脈ラインを確保した。内頸動脈ラインより持続的に動脈圧を測定し、また動脈血採血用ラインとして用いた。循環動態が安定した後、ほぼ通常の換気量 (本実験では低一回換気量と定義する、8 ml/kg)にて人工換気を開始した。換

気と呼吸状態が安定した後、筋弛緩薬パンクロニウム 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 にてパ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 30 %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 小胞体生理食塩水分散液 (HbV)、Hb 小胞体 5%アルブミン分散液 (HbValb)、5%アルブミン (alb) と生理食塩水 (saline) 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。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。

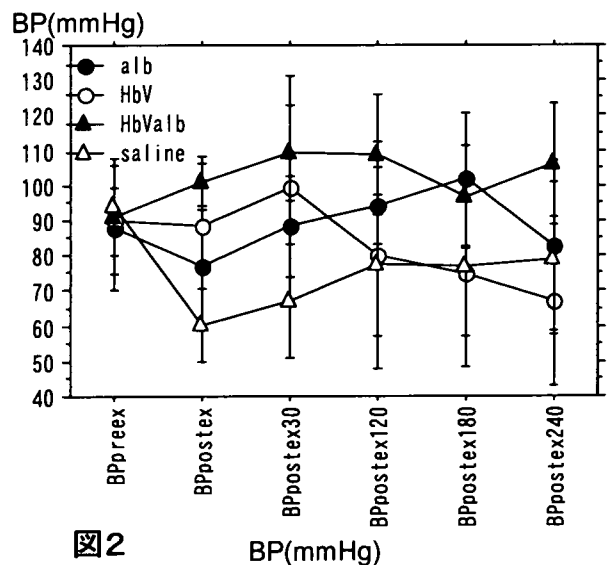
C. 研究結果・考察

ヘマトクリットは HbV 群では交換前 $38\pm 2\%$ から交換後 $30\pm 2\%$ 、HbValb 群では交換前 $41\pm 2\%$ から交換後 $24\pm 3\%$ 、alb 群では交換前 $39\pm 3\%$ から交換後

$21\pm 1\%$ 、生食群では交換前 $38\pm 2\%$ から交換後 $25\pm 3\%$ 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約 30%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生理食塩水に比べて低めであった。



平均体血圧は時間とともに徐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したため、血圧の低下につ

ながつたと考えられた。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群がやや高値を保ったが有意差は見られなかった。動脈血酸素分圧は時間経過とともに全群で低下傾向が見られた。(preex:脱血交換前、postex:脱血交換後)。HbV群では若干低下が緩やかである可能性が考えられた。また、分散液として5%アルブミンを用いた群では生理食塩水を分散液とした群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たが有意差は無かった(図3)。

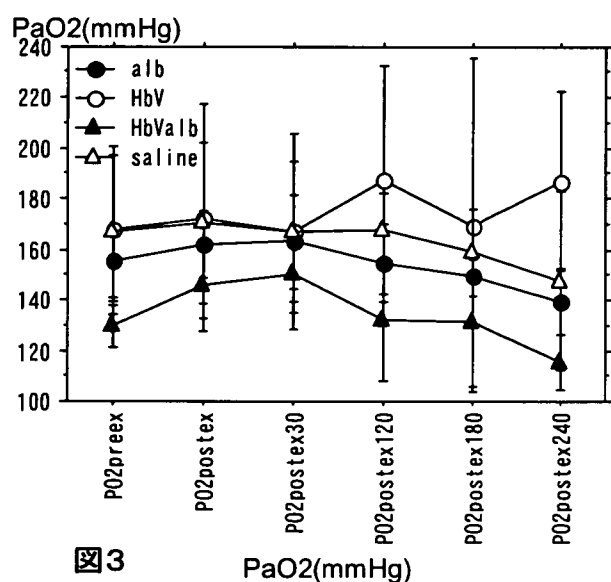


図3

湿乾重量比は群間で有意差は見られなかった。HbVを含んだ試料で若干低下する可能性が考えられた(図4)。

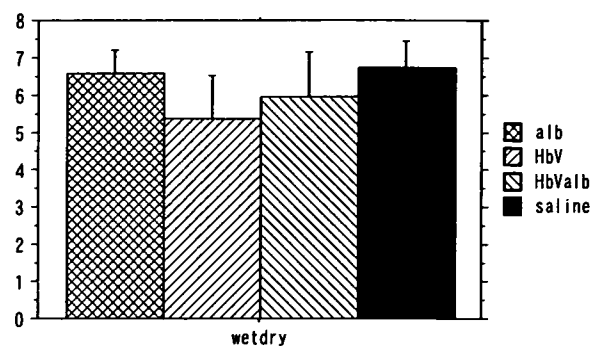


図4 湿乾重量比

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。切除肺においては全群で軽度の肺水腫が見られた。また、全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、その後白血球の活性化、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た。生理食塩水投与に加えて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。今回の検討では生理食塩水分散群と 5%アルブミン溶液分散群の間に明らかな差は見られず、今回検討した VILI の範疇ではこのような可能性は無いと推察された。換気量を増加させた検討も考慮する必要があると考えられた。

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、この両者間で明らかな違いは見られなかった。しかし実際の臨床では 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。

①平成 19 年度

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り、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。

D. 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 pCO₂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±2%から交換後 26±1%、alb 群では交換前 39±1%から交換後 16±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)。

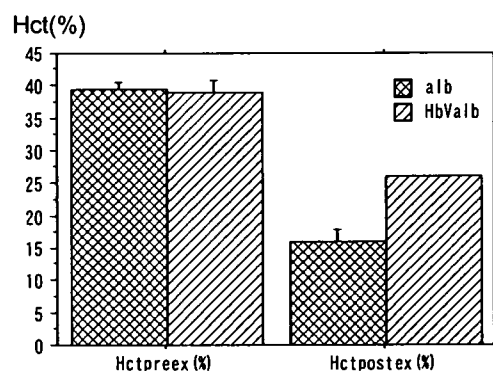


図1 Hct(%)

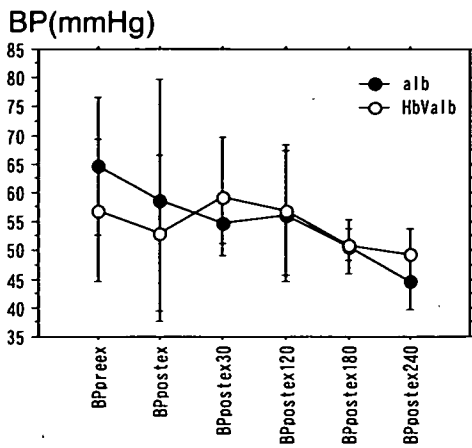


図2 BP(mmHg)

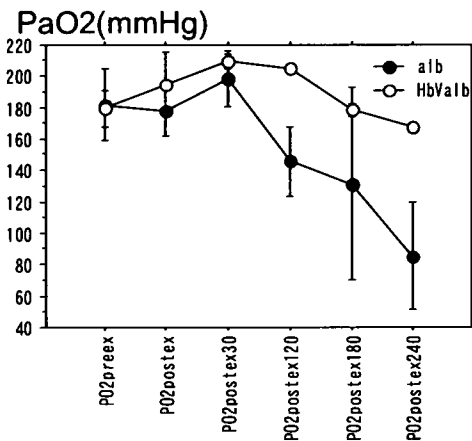


図3 PaO₂(mmHg)

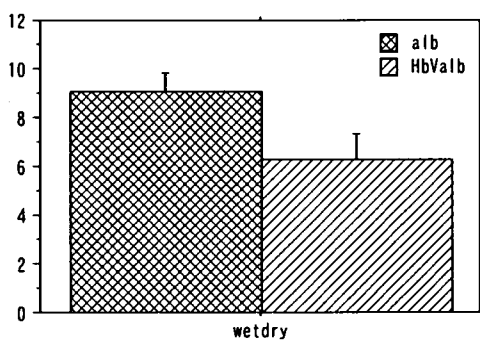


図4 湿乾重量比

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。

②平成 17 年度

A. 研究目的

ICU 管理を要する症例の多くは単一ではなく、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ある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。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と考えられている。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。出血性ショックはまた SIRS 状態を惹起する代表的な原因の一つである。

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、ヘモグロビン小胞体 HbV 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 α が上昇することが確認されており、この上昇は HbV 投与により抑制された。同じモデルを用いて TNF α を含む複数のサイトカインの推移を確認することが必要となる。しかし網羅的なサイトカイン測定にはコストがかかる。測定が最も適切に行える出血ショックおよび蘇生条件を十分に設定する必要がある。腸管虚血により腸管粘膜バリアが破綻した場合には、腸管に付属するリンパ節に腸内細菌が移行することが報告されている。そこで本研究では先ず出血性ショック時の SIRS 状態のより簡便な評価法として、腸管リンパ節の培養を試みた。

B. 研究方法

動物種：Wistar 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、盲腸の表面を擦過した後閉腹した。4 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 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。その後カテーテルを抜去し血管を処置後生存させた。4 日後麻酔下に腹部正中切開を行い、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。試料としては5%アルブミンおよび5%アルブミンで調製した HbV (ヘモグロビン濃度約 8 g/dl) を用いた。

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盲腸の漿膜擦過後 4 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。腹腔内に腹水の存在は明らかではなかった。開腹部に明らかな癒着は見られなかった。その他、腹腔内に明らかな炎症所見は見られなかった。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、リンパ節腫大が疑われた。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。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 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。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。病理組織学的にはリンパ節が確認されたが、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。

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。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。従来の報告では、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。本研究では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。培養方法などを見直すことも必要と考えられたが、加えた侵襲が少なすぎた可能性が最も高いと考えられた。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を検討する。これに基づき、出血性ショック後腸間膜リンパ節培養が陽性化する条件を設定する。この条件下に行った出血ショック蘇生プロトコールにおいてサイトカイン測定を計画する。

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。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。腸間膜リンパ節の培養で陽性結果は得られず、ショックのレベルをさらに強くし、検討を行う必要があると考えられた。

②平成 18 年度

A. 研究目的

ICU 管理を要する症例の原因の多くは単一ではない。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性ショック時に血中の TNF α 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 α 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。しかし網羅的なサイトカイン測定にはコストがかかるとともに、測定が最も適切に行える出血性ショックおよび蘇生条件を十分に設定する必要がある。腸管虚血により腸管粘膜バリアが破綻した場合には、腸管に付属するリンパ節に腸内細菌が移行することが報告されている。そこで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。

C. 研究方法

動物種：Wistar 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、盲腸の表面に穿刺創を作成した後縫合閉鎖し閉腹した。4 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 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。その後カテーテルを抜き去り血管を処置後生存させた。4、7 日後麻酔下に腹部正中切開を行い、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。試料としては 5%アルブミンおよび 5%アルブミンで調製した HbV (ヘモグロビン濃度約 8g/dl) を用いた。

実験④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。

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盲腸の穿刺創の修復4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癒着が見られた。腹腔内に腹水の存在は明らかではなかった。開腹部に明らかな癒着は見られなかった。その他、創部周辺には癒着とともに軽度の炎症所見が見られたが、その他の腹腔内に明らかな炎症所見は見られなかった。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、リンパ節腫大が疑われた。しかし、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。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代表的炎症性サイトカインとしてTNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10を測定した。出血性ショック蘇生後1日目の測定ではTNF α の上昇が一部の動物で示唆された。出血性ショック蘇生後2日目の測定ではIL-6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。

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。今回の検討でも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。従来の報告では、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。本研究では今回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。また、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。しかし、予備実験では40%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。これに基づき、出血性ショック後腸間膜リンパ節培養が陽性化する条件を設定する。この条件下に行った出血性ショック蘇生プロトコールにおいてサイトカイン測定を急性および亜急性期にある程度長期的に上昇する因子にしばって計画する。

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。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。腸間膜リンパ節の培養で陽性結果は得られず、ショックのレベルをさらに適切化して検討を行う必要があると考えられた。また測定するサイトカインについても絞込みが必要と考えられた。

②平成 19 年度

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 α 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 α 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。

D. 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°C 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。