

200808005A

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

(研究課題番号：H18-医薬-一般-022)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀之内 宏久

(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 21 (2009) 年 4 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

(研究課題番号：H18-医薬-一般-022)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀之内 宏久

(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 21 (2009) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	1
堀之内 宏久 (慶應義塾大学 医学部 外科 准教授)	
II. 分担研究報告書	
1. 堀之内 宏久 (慶應義塾大学 医学部 外科 准教授)	6
2. 小林 紘一 (慶應義塾大学 医学部 外科 名誉教授)	16
3. 池田 久實 (北海道赤十字血液センター 所長)	24
4. 小田切 優樹 (熊本大学大学院 医学薬学研究部 教授)	31
5. 高折 益彦 (東宝塚さとう病院 名誉院長 / 川崎医大名誉教授)	38
6. 土田 英俊 (早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員 / 早大名誉教授)	40
7. 酒井 宏水 (早稲田大学 理工学研究所 准教授)	53
8. 甲斐 俊哉 (ニプロ㈱ 医薬品研究所 所長)	66
9. 高野 久輝 (ニプロ㈱ 人工臓器開発センター センター長)	69
10. 饗庭 了 (慶應義塾大学 医学部 心臓外科 准教授)	75
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	79
IV. 研究成果の刊行物・別冊	83

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

研究代表者 堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 准教授

研究要旨

我々が開発を進めている人工酸素運搬体Hb小胞体は、期限切れの献血血液よりヘモグロビンを高純度に分離精製、濃縮し、アロステリック効果薬を添加して脂質2層膜で被覆した、ユニークなリポソーム製剤である。この種の製剤を臨床応用するにあたって、動物での毒性、効果を検討するとともに、企業との共同研究・開発体制を進めることが臨床応用には不可欠である。また、薬品としてヒトに安全に投与する為にはGMP製剤を製造することが必要であり、GMP製造にかかわる技術を明らかとする必要がある。本研究では多岐にわたる検討を実施し、下記の結果を得た。

A. Hb小胞体の物性の詳細について、① 小角X線散乱法を用いた高濃度Hb溶液中の分子間相互作用について検討し、弱い静電反発の高度なバランスによって流動性を失わず機能を保持していた。② Hb小胞体の一酸化窒素(NO)、一酸化炭素(CO)との反応性を検討し、NOではHb小胞体粒子内のHb溶液が拡散障壁となり、反応速度が減少していたが、COの反応性はわずかに減少したのみであった。③ HbVが血中に存在するときの臨床検査、特に電解質測定が正確に評価できるかについてドライケミストリー法と電極法で検討したところ、Hb小胞体を分離しないと正確な評価が困難となると考えられた。

B. 動物投与試験により、④ Hb小胞体の体内動態、特に頻回投与時のAccelerated Blood Clearance (ABC現象) についてマウスを用いて検討したところ、臨床で用いられると考えられる1400 mg/kgの容量ではABC現象は誘導されなかった。⑤ 免疫系の変調をきたす要は、脾臓内のHb小胞体の貪食細胞のフェノタイプリングから、CD11陽性、CD172陽性であると考えられた。⑥ 動物種の違いによるHb小胞体の反応性の違いを調べる目的で、豚における投与モデルを作成し、DPPG系小胞体の投与により予想した肺高血圧が発生することを確認し、Hb小胞体投与モデルとして適していることを確認した。⑦ 出血性ショックに対するHb小胞体の使用に関する検討(制御不能出血の治療法の蘇生に関する検討)を行ったところ、生存率を向上させたが、出血が制御できなければ、輸液蘇生のみでの生命維持は困難であった。⑧ 手術での使用を想定したHb小胞体の使用ではマウス肺全摘モデルを用いたが、術後経過、創傷治癒に影響は認められなかった。⑨ 体外循環の充填液としての使用する際の脳血流、脳実質酸素分圧の変化を測定し、Hb小胞体を初期充填に使用した群で体外循環離脱後の脳血流の変動が少なく、高次脳機能の保持に関与している可能性が示唆された。⑩ Hb小胞体分散液を臓器保存液として検討し、膵島移植においては保存条件の向上につながる事が明らかとなった。

C. 製剤化を行うための研究として、⑪ 脂質のバイオバーデン管理向上の方法を検討、⑫ 臨床試験に応用可能な希釈式自己血輸血を参考に治験モデルを策定した。

以上の検討より、GLP試料による動物モデルにおいてHb小胞体による副作用、有害事象は認められず、生体適合性、効果の点で現試料が有効に機能することが明らかとなった。今後はGMP製剤の製造法を確立するとともに、Hb小胞体使用時の病態生理学的な検討を積み重ねる必要があると考えられた。

研究分担者

小林 紘一	慶應義塾大学医学部外科 名誉教授
池田 久實	北海道赤十字血液センター 所長
小田切 優樹	熊本大学大学院医学薬学研究部 薬物動態制御学 教授
高折 益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長 (川崎医大 名誉教授)
土田 英俊	早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員 (早大 名誉教授)
酒井 宏水	早稲田大学 理工学研究所 准教授
高野 久輝	ニプロ(株)人工臓器開発センター センター長
甲斐 俊哉	ニプロ(株)医薬品研究所 製剤研究室 室長
饗庭 了	慶應義塾大学医学部 外科 准教授

A. 研究目的

欧米を中心として赤血球の代替としての人工酸素運搬体(修飾Hb溶液系)の研究が進んでいるが、我々が研究しているHb小胞体に対する関心も高い。Hb小胞体は、期限切れの献血血液より高純度に分離、精製したHb溶液を40g/dLに濃縮し、脂質2層膜で被覆した後に表面修飾を行い、凝集を低減するとともに血管内皮や他の血球成分との反応性を低下させ、血中滞留時間を増加させた、我国独自の

ユニークな人工酸素運搬体である。粒子内部Hb性状、アロステリック効果薬の選定、膜表面の修飾技術、膜成分の選定などは前期の厚生労働省科学研究を通して得られた成果により、GLP試料製造へ行かされている。平成20年度は、GLP試料を用いて、その物性の詳細、動物を用いた検討による生体反応性及び治療有効性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

使用したHb小胞体試料は、本年度よりニプロ(株)により製造されている。この試料を用いて以下の方法で検討を行った。

A. 物性の検討では、① 小角散乱X線の測定にはSAXSessを用い、イメージプレート検出器を用いて記録した。すべての測定は試料投下後にプライマリービーム強度を規格化することで透過率補正を行い、標準試料の強度設定より絶対強度補正を行った。これにより試料中のHbの粒子構造、構造因子分析によるHb間相互作用ポテンシャルを分析した。② ストップドフローラビッドスキャン分光法によって種々の条件下でのHb小胞体の一酸化窒素、(NO)、一酸化炭素(CO)との反応性について検討した。③ Hb小胞体生食分散液あるいはヒト血液と混合した血液中の分散状態の溶液とを用い、電極法、およびドライケミストリー法によって正確な測定が可能かについて検討を行った。④ また、リン脂質2層の疎水領域におけるNO消費の可能性を確認

するため、NO濃度の推移を電極法にて検討した。

B. 動物を用いた検討では、⑤ Hb小胞体を頻回に投与した場合のABC現象の評価はマウスに放射化ラベルした0.1 mg/kgおよび1400 mg/kgのHb小胞体を頻回投与し、血中濃度、肝脾での分布を検討した。また、ABC現象にかかわるIgM抗体、IgG抗体の有無を確認する為に固相化プレートを用いた発色法にて検討した。⑥ Hb小胞体投与後にラットで認められる脾臓に誘導される免疫抑制細胞を同定するため、FITC標識小胞体を用いて貪食細胞のフェノタイプを同定し、免疫抑制の機序を検討した。⑦ ラットにおいて腹部大動脈穿刺による制御不能出血によるショックの組成にHb小胞体を使用し、生食あるいはアルブミン生食との間に蘇生効果の比較を行った。⑧ マウス左肺を全摘し、同時に0.3mlの出血を起こした後にHb小胞体分散液を含む輸液を行い回復過程を観察した。⑨ ラットに体外循環を確立、200ml/kg/minで体外循環を90分運転した。体外循環回路の初期充填液をアルブミン生食とHbV分散アルブミン生食とする群を作成、脳血流と脳組織酸素分圧の変化を計測した。⑩臓器保存の検討を行うためにラット脾臓を分離保存する際にHbV含有液を用い、移植後の機能を調べた。

C. 製剤化および臨床研究へ向けた検討としては、⑪ 脂質のバイオーバーデン管理向上の方法を検討、⑫ 粒子状物質に対する新しい滅菌技術の開発を行った。⑬ 臨床試験に応用可能な希釈式自己血輸血を参考に治験モデルを策定した。

C. 結果

平成20年度の研究の結果は以下のとおりである。

A. Hb小胞体の物性を検討した結果、

① 高濃度のHb溶液中でHb蛋白は相互に弱い静電作用により、凝集、結晶化をせずに分散状態を保ち、酸素運搬機能を発揮していることが明らかと

なった。② ストップフローラピッドスキニング法によって、Hb小胞体の一酸化窒素(NO)との反応は、粒子内の濃厚Hb溶液にNOが反応する過程で、拡散障壁が形成されることにより、NOとの緩やかな反応を示す機序が明らかとなった。もともと反応の遅い一酸化炭素(CO)は、拡散障壁の影響は殆ど無く、反応の遅延は無かった。③ Hb小胞体生食分散液あるいはヒト血液と混合された状態では正確な電解質濃度の評価は、臨床検査装置によっては困難を伴うことがあり、Hb小胞体を検体より除去することが必要であった。④ リン脂質2層膜の疎水領域におけるNO消費の可能性は、NO電極を用いた検討ではほとんど無視できると考えられ、リン脂質膜でのNOの分解、変化は起こらないと考えられた。

B. 動物を用いた検討では、

⑤ Hb小胞体を頻回に投与した場合のABC現象は低用量投与では起こるものの、臨床で投与される量では細網内皮系が飽和されるため、起こらないものと考えられた。また、ABC現象にかかわるIgM抗体、IgG抗体の有無を検討したところ、IgG抗体は認められないが、脂質構成成分のDSPE-PEGに対するIgM抗体の産生が認められた。⑥ Hb小胞体投与後に起こる免疫抑制状態は脾臓内に存在するCD11⁺、CD146⁺細胞による可能性が示唆された。⑦ ラットにおいて腹部大動脈穿刺による制御不能出血によるショックの蘇生試験では、Hb小胞体により生存率の改善が認められ、乳酸・ビルビン酸比の上昇抑制が認められた。また、腎破裂モデルでもHb小胞体投与群で組織酸素分圧の上昇が認められた。⑧ マウス肺全摘後、出血を補てんする輸液として乳酸化リンゲルを投与した群よりもHb小胞体を投与した群のほうが体重減少が少なく、回復が早かった。その他の指標でもHb小胞体が輸血と同程度に回復過程を促進した。⑨ 体外循環中はヘマトクリットが40%から13%に低下するが、脳血流は軽度増加、脳組織酸素分圧も軽度増加すると

どまるため、アルブミン生食充填群では酸素供給は減少するのが認められた。アルブミン生食群では体外循環後の脳血流の減少の程度が著しく、変化率を比較するとHbV小胞体群のほうが血流の変動幅が少ない傾向があった。⑩ 膵島を分離、精製する際に培養溶液中にHb小胞体を分散させると糖尿病マウスの血糖コントロールが良好となり、移植膵島の生着率が向上していた。また、viabilityも向上していた。

C. GMP製剤化の検討として、

⑪ 一般的に滅菌が困難といわれている脂質混合物あるいは脂質分散液に対する滅菌法に対する安定性、滅菌効果を評価した。⑫ 超高压による滅菌法について検討し、30℃、1万気圧、10分で滅菌が可能であった。⑬ 臨床応用の際には現行で行われている体外希釈式自己血保存による自己血輸血方式を利用して、Hb小胞体輸注を行うことによって輸血のトリガーを遅らせる方式の臨床研究モデル案を策定し、研究班で討議した。

D. 考察

以上の結果から下記のごとく考察した。

A. Hb小胞体の物性の検討の結果、① 高濃度のHb溶液を脂質2層膜で被覆しても小胞体内でHb溶液が流動性を保って機能することが理論的に裏付けられた。② ストップドフローラピッドスキャン分光法によるHb小胞体とNOの反応は拡散障壁の形成によって緩やかなものとなっていることが明らかとなり、FreeのNOによる血管作動性を緩和していると考えられた。③ 微粒子分散系は臨床検査の正確な評価を阻む最大の要因で、Hb小胞体含有の分散液ではHb小胞体を分離する操作が必要と考えられた。④ リン脂質2重膜はNOの消失には殆ど関与しておらず、投与後に内因性NOの動態に影響は与えないと考えられた。

B. 動物を用いた検討結果からは、⑤ Hb小胞は臨

床では細網内皮系を飽和する量が投与されるので、ABC現象起こらず、頻回投与でも半減期の極端な短縮は起こらない可能性が高いと考えられた。しかし、脂質膜成分に対するIgM抗体の出現は長期的な抗体の消長を検討する必要があると考えられた。⑥ Hb小胞体投与後に起こる免疫抑制状態の機序が解明されたが、この変化が出血性ショック後の病態あるいは術後の病態に変化を与えるかを今後検討すべきであると考えられた。⑦ 昨年度までに、ビーグル犬を用いた中長期のHb小胞体の生体適合性試験では、1年にわたって、成長、臓器機能、情緒変化で異常を認めず、安全な製剤であると考えられ、GMP製剤での再検討が期待された。そこで今年度は、制御不能出血に対するHb小胞体の使用を検討し、灌流の低下する臓器の酸素代謝(好気性解糖、TCAサイクルによるATP産生)を最低限維持する可能性が示唆された。⑧ マウス肺全摘後、出血を補てんする輸液としてHb小胞体は有効と考えられ、創傷治癒過程の詳細解析が必要と考えられた。⑨ Hb小胞体含有の初期充填液を使用することによって体外循環前、中、後の脳血流の著しい変化をきたさないことが高次脳機能の保持に役立っていると考えられた。微小循環を含めた解析が必要と考えられた。⑩ マウス膵島分離培養移植実験ではHb小胞体の使用で生着率が向上したが、積極的な酸素供給が膵島移植の成績向上に寄与した可能性が考えられた。

C. GMP製剤化の検討として、

⑪ 脂質混合物あるいは脂質分散液に対する滅菌法に対する安定性、滅菌効果を評価し、滅菌過程での脂質の分解は温度、pHに依存しており、脂質の安定性を確保できる滅菌工程の開発が引き続き必要であると考えられた。⑫ 超高压による滅菌法について検討し、滅菌条件を確立することができると考えられた。⑬ 臨床応用の際には、体外希釈式自己血保存による自己血輸血方式を利用したモデルが臨床応用で検討すべき方法であると考えら

れた。

E. 結論

Hb小胞体の物性の検討からは、小胞体内のHb酸素のみならず、他の生理活性ガスとの関与が明らかとなり、病的状態でも生体に有利に働く可能性がある。動物での検討から免疫への影響が詳細に明らかになりつつあり、薬物動態の上からも臨床応用時の基礎情報となりうる。中型動物を用いた出血性ショック蘇生の検討では、中長期的な安全性が確認されているものの、制御不能出血に対する蘇生に用いると生存率は改善するが、血圧の上昇

は得られず、投与法の改良が必要である。術後経過にHb小胞体は有害作用を起こさないが、手術に使用した場合の創傷治癒についての検討を必要とする。体外循環の初期充填に用いることが可能と考えられる。脾臓移植に使用可能であるがさらなる検討が必要と思われた。GMP製剤の開発にあたり、滅菌技術を確立することが最大の課題で高圧による滅菌技術を発展させるべきである。

今後はGMP製剤の開発を進めつつGLP試料による使用時の問題点を想定し、解決を図るべきである。

分担研究報告書

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

- 分担課題：1. マウス肺切除術中出血モデルでのHb小胞体投与の安全性と有効性の検討
2. 制御不能出血に対するHb小胞体を用いた生存率向上についての検討

主任研究者 堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 准教授
研究協力者 河野 光智 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助教
研究協力者 勢司 泰久 慶應義塾大学 総合医科学研究センター 助教

研究要旨

(1) 輸血の代用として開発されたHb小胞体は、血液型がなく、ウイルスなどの感染源を排除、室温で2年以上の備蓄が可能であり、出血性ショック蘇生液としての効果と安全性が動物実験において実証されている。臨床応用を視野に入れ、ビーグル犬を用いての交換輸血後の長期生存試験などが進行している。しかしながら輸血の頻度が高い待機手術への応用に関する研究は遅れている。そこでマウスに肺切除と同時に循環血液量の25%を脱血を行う、周術期出血を想定した動物モデルを新たに作成した。このモデルを用い、乳酸リンゲル液、5%アルブミン生食液、マウス保存血液、そしてHb小胞体分散液を輸液し、体重、摂食量、自発運動量の変化を観察した。回復の過程を比較することで、Hb小胞体の有効性と安全性を検討した。いずれの群においてもマウスは術後、長期生存可能であった。Hb小胞体の投与により、術後早期の体重減少は乳酸リンゲル液投与と比較して抑制される傾向にあった。また、マウス保存血輸血よりも術後早期の体重減少は大きいものの、4日目以降は同等に回復した。摂食量は術直後に低下するが、7日目まで群間で有意差を認めず、回復した。術後に低下した自発運動量も群間に優位差を認めずに回復した。Hb小胞体は、外科手術による出血に対しても安全に使用できる可能性が示唆された。(2) 人工酸素運搬体として開発がおこなわれているHb小胞体は出血性ショックの蘇生に効果があることが現在までの厚生労働省科学研究で明らかにされてきた。今回、大血管や実質臓器損傷による制御不能出血に対し、Hb小胞体を用いた蘇生が生存時間、生存率にどのような影響を及ぼすかについてラットモデルを用いて検討した。制御不能出血モデルとしては平成18年に確立した大動脈損傷による出血モデルを用いた。両モデルともに無蘇生群、生食蘇生群、輸血蘇生群、5%アルブミン生理食塩水蘇生群、Hb小胞体蘇生群で比較したところ、Hb小胞体蘇生群で生存率の上昇を認めた。乳酸/ピルビン酸比の比較では蘇生直後の比較では生存個体において酸素代謝の阻害が抑制されている可能性が示唆され、血圧が低く、灌流が悪い状況でもHb小胞体は組織への酸素運搬が行える可能性があると考えられた。

1. マウス肺切除術中出血モデルでのHb小胞体投与の安全性と有効性の検討

A. 研究目的

人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体(HbV)が血液中で酸素運搬体として機能す

ることは、ラットにおける交換輸血試験で確認され、90%の脱血交換試験でも生存が可能であった。交換輸血のみならず、出血性ショックの蘇生に用いた場合も良好な成績が得られ、最も臨床応用に近いと考えられている。安全性試験としては白血球によるサイトカインの産生の変動、血小板に与える影響を始めとし、薬理動態、血清学的変化についての基礎検討、細網内皮系の活性化を含む代謝過程の解明が行われている。

臨床応用を視野に入れ、ビーグル犬を用いての交換輸血後の長期生存試験や、人工心肺のプライミング液として応用すべく研究が進行中である。しかしながら、輸血の頻度が高い待機手術への応用に関しては、その研究は遅れている。

そこで本研究ではマウス肺切除モデルで、同時に術中出血させるモデルを作成し、術後侵襲からの全身状態の回復に対する HbV 投与の安全性と効果とを検討した。

B. 研究方法

C57BL/6 マウス (雄性、8~10 週齢、20~22g) にケタミン(90mg/kg body weight)+キシラジン(9mg/kg body weight)を皮下注射し、麻酔下にて 20G サーフローにて経口挿管を行い、FiO₂ 0.21、一回換気量 0.20ml(12.5ml/kg)、換気回数 100/分、PEEP 2cm/H₂O の条件下で人工呼吸器管理をした。左第 5 肋間にて開胸し、左肺門部を気管支、肺動静脈とともに 3-0 絹糸で結紮後、切断し、左肺を切除した。3-0 絹糸を X 字にかけて肋間を閉じ、筋層皮膚を一層で 3 針縫合して閉創する。

手術後、尾端を切断し尾静脈から 0.3ml 出血を起こさせた。その後、30G 注射針を用いて尾静脈から 0.3ml の異なる輸液を行い (25%血液交換)、以下の実験群を作成した。

1. 乳酸リンゲル液群 (Ringer 群)。
2. 5%アルブミン群：リコンビナントヒトアルブミンを生理食塩水に 5%濃度になるように溶

解した群 (rHSA 群)

3. ヘモグロビン小胞体群：HbV を 5%アルブミン生食に分散した液体。Hb 濃度は 8.6 g/dl (HbV+rHSA 群)
4. 同種間の輸血群 (ASB 群：Autologus shedded blood)

予備実験により、出血量を変化させて、最適と思われる出血量を決定した。少ないと回復の様子を確認するのが困難で、出血量が多すぎるとマウスが死亡してしまう。

それぞれの群のマウスをその後 7 日間にわたり、体重、摂取カロリーを観察した。また、一部のマウスはそれに加え、輪を回転させる遊具を用いてその回転数を測定することによって自発運動量の計測も行なった。

倫理的配慮：実験プロトコールは慶應義塾大学医学部実験動物センターおよび動物実験委員会の承認を得て行なわれ、実験動物に関しては、十分な麻酔下にて実験を試行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

C. 結果および考察

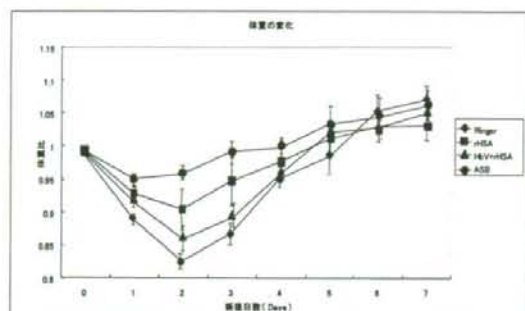
1. 体重変化

手術時に技術的な問題があったもの以外は、いずれの群でもマウスは長期生存した。

体重変化率は手術直後の体重に対する比で表した。すべての群で、術後 2 日で最も体重が減少し、その後回復とともに体重が増加した。すべてのマウスで、術後 7 日経過後には術前よりも体重が重くなるほど回復した (Figure 1)。特に体重が減少が著しい術後 2 日目において Ringer 群と ASB 群との群間で有意差を認めた。有意差を認めなかったものの、ヘモグロビン小胞体の投与により、術後早期の体重減少は乳酸リンゲル液投与と比較して抑制される傾向にあった。それぞれの群の体重の平均値が手術直後の体重まで回復するのにかかった日数は、Ringer 群では 5.03 日、rHSA 群では 4.46

日、HbV+rHSA 群では 4.50 日、ASB 群では 3.23 日であった。

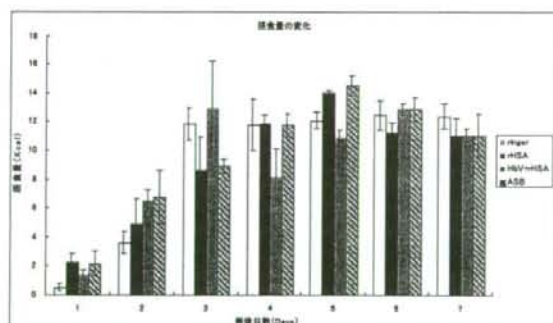
Figure 1



2. 摂取カロリーの変化

いずれの群においても手術直後は摂食がほとんどなくなり、その後摂食量が増加した。rHSA 群と ASB 群では術後 5 日目に、Ringer 群と HbV+rHSA 群では術後 6 日目に摂食量は最高値となった。すべての群間で有意差は認めなかった。

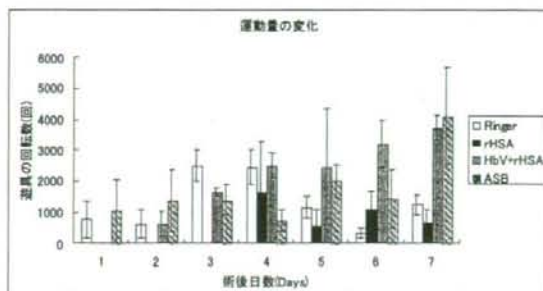
Figure 2



3. 自発運動量の変化

いずれの群においても手術直後は自発運動がほとんどなくなり、その後回復した。HbV+rHSA 群では 2 日目以降、7 日目まで自発運動量は増加し続けた。術後日ごとの有意差検定では、すべての群間で有意差は認めなかった。

Figure 3



D. 考察

人工酸素運搬体・HbV の外科手術における使用の有効性と安全性に関して、肺切除に比較的少量の出血を加えたモデルを新たに作成し、検討した。その結果、ヘモグロビン小胞体の投与により、術後早期の体重減少は乳酸リンゲル液投与と比較して抑制される傾向にあった。また、同種間輸血よりも術後早期の体重減少は大きいものの、4 日目は同等に回復した。摂食量は術直後に低下するが、同種間輸血とほぼ同等に回復した。術後に低下した自発運動量も群間に優位差を認めずに回復した。これらの結果から、ヘモグロビン小胞体は、外科手術による出血に対しても安全に使用できる可能性が示唆された。

今回の実験での出血量は循環血液量のおよそ 25%となる 0.3ml に設定した。これは予備実験において、左肺全摘後に 0.3ml を超える多量の脱血を行うと出血性ショックに陥り、直後に輸血を行っても蘇生することが不可能であったためである。循環血液量の 25% という比較的少量出血の条件下では、乳酸リンゲル液、5% アルブミン液、ヘモグロビン小胞体或いはマウス保存血のいずれの輸血、輸血を行っても、マウスは術後、長期生存しえた。また体重変化と摂食量、自発運動量も同等に回復し、乳酸リンゲル液や 5% アルブミン液を凌駕するヘモグロビン小胞体の優位性を示すには至らなかった。ヘモグロビン小胞体の人工酸素運搬としての機能を評価するには、循環血液量の 25% を超え

る血液交換を行う厳しい条件設定が必要があると考えられた。

2. 制御不能出血に対するHb小胞体を用いた生存率向上についての検討

A. 研究目的

外傷による出血の治療の基本は止血と出血によるショック状態の改善である。出血の伴って起こる血圧の低下と循環血液量の減少により、組織の灌流が減少し、低酸素状態に陥ることにより、機能不全に陥ると考えられており、止血を適正な輸液、輸血により臓器の機能不全を改善することで治療目的が達成できる。

外傷による出血は受傷現場で止血ができるものばかりではなく、むしろ、出血が十分に制御できない状態で後方の医療施設へ搬送することが求められる場合が多い。このような制御不能出血症例に対して初療段階でどのような輸液による蘇生を行えばよいのかについては明らかな指針はない。今回われわれは、制御不能出血に対してHb小胞体を用いた蘇生液を用いて生存率と組織の酸素代謝に与える影響について検討した。モデルとしては大血管損傷モデルとして開腹・腹部大動脈穿孔モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

12週齢340gの雄性Wisterラットを使用した。エーテル麻酔後にセボフルレン2%の吸入麻酔とし、仰臥位で保温マットの上にテープで固定した。測定用のカテーテルを右外頸静脈にSP45カテーテルを蘇生液注入用として、右頸動脈にSP45チューブを脱血用カテーテルとして、左大腿動脈にSP31チューブを測定用カテーテルとしてそれぞれ留置した。

腹部正中切開を行い、腸管を右側に寄せ、後腹膜を露出、後腹膜を切開し、腎動脈株の腹部大動脈を露出、剥離、大動脈背部に4×10mmのプラスチックシートを挿入した。腸管の移動により出血点がふさがれることを防ぐためのプラスチック装具を大動脈周囲に装着し、さらにサランラップで覆って乾燥を防ぐようにした。

蘇生液は生理食塩水、輸血(別の固体より採血を行いCPD溶液を採血量の10%の量を加え、凝固を停止させた)、5%アルブミン生食(ヒトリコンビナントアルブミンに4倍量の生理食塩水を加えて作成)、HbV分散液(ヘモグロビン濃度を10g/dlとして生理食塩水に分散させた試料に25%広リコンビナントアルブミンを加え、5%アルブミン濃度となるように調整した)を用いた。

蘇生液の輸注速度と輸注量は想定出血量を基準として決定した。想定出血量を循環血液量(56ml/kg)の30%と仮定し、生食群では出血量の3倍量を他の群では予想出血量と等量を生食群では3ml/min、他の群では1ml/minの速度で輸注することとした。体重350gのラットでは循環血液量は19.6ml、想定出血量は5.88mlであり、生食にて蘇生する場合は3ml/minで約6分、他の蘇生液を用いる場合は1ml/minの速度で蘇生を行った。

循環動態が安定化した20分後より実験を開始した。制御不能出血は剥離露出した大動脈を24G針にて背部に敷いたプラスチックシートまで貫通するように針を穿刺し、引き抜くことで出血を惹起した。

出血蘇生後MAP20mmHgに達した時点(通常2分以内)から蘇生を開始した。

蘇生開始後連続的に血圧、心拍、をモニターし、経時的に呼吸数を測定した。血中乳酸、ビルビン酸、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット、白血球数、血小板数を測定するために蘇生開始後30分と2時間後に1mlの採血を行い、その後1ml生食を輸液した。

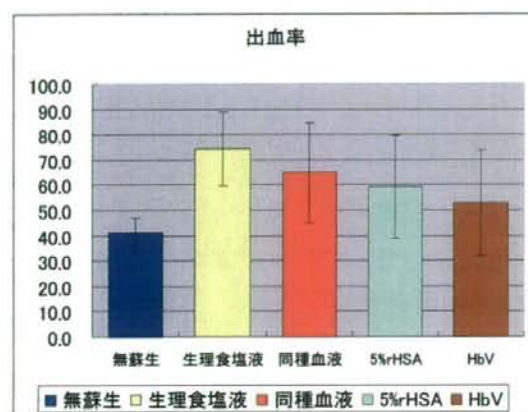
動物が死亡した場合は死亡時刻を記録した。

生存率はKaplan-Meier法で解析し、Log rank testで検定した。他の指標は平均値を t 検定を用いて解析した。

C. 結果

1. 出血量

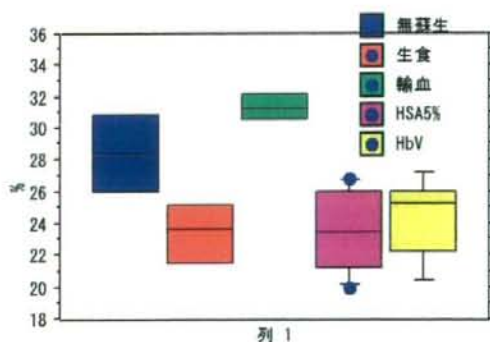
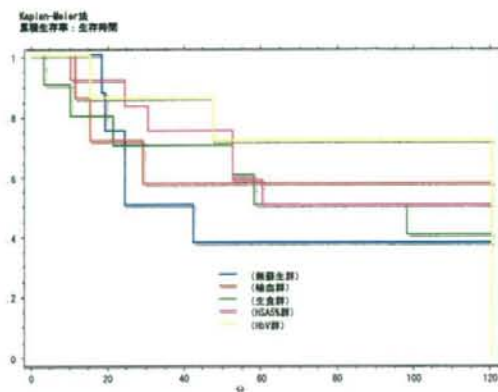
全例で2分以内に血圧が20mmHg以下に減少し、大量の血液が腹腔に流出した。出血量は無蘇生群で 8.0 ± 0.9 ml、生食群で 14.3 ± 2.9 ml、輸血群で 12.6 ± 4.1 ml、5%アルブミン生食群で 11.8 ± 4.0 ml、Hb小胞体群で 9.8 ± 3.7 mlであった。



2. 生存時間

生存率はKaplan-Meier法で検討した。各群ともに2時間の観察期間を通して生存する個体が認められた。Log rankテストでは有意差を認めなかったが、Hb小胞体にて蘇生した群で生存率が改善する傾向が認められた。

と考えられたが、その低下は予想より低く、(約20mlの循環血液量があり、実験期間中に約14mlの出血があり、18mlの輸液を短時間で行なっている)ので、単純な計算ではHt初期値42%たので、 $0.42 * (20-14) / 24 = 0.105$ となり、10%程度のHtとなると考えられた) 輸注した生理食塩水のかなりの部分が血管外に漏出した可能性が示唆された。血漿成分の漏出は5%アルブミン生食群やHbV群でも認められると考えられた。



3. ヘマトクリット

生存した個体の観察終了後のヘマトクリットは無蘇生群($28.4 \pm 3.4\%$)、生食群($23.3 \pm 2.4\%$)、5%アルブミン生食群($23.5 \pm 2.4\%$)、輸血群($31.4 \pm 1.3\%$)、HbV小胞体分散液群($24.2 \pm 2.7\%$)であり、輸血群と生食群、輸血群と5%アルブミン生食群、輸血群とHbV群で有意差を認めた。生食群では大量の組成液の輸中を行ったため、ヘマトクリットが低下した

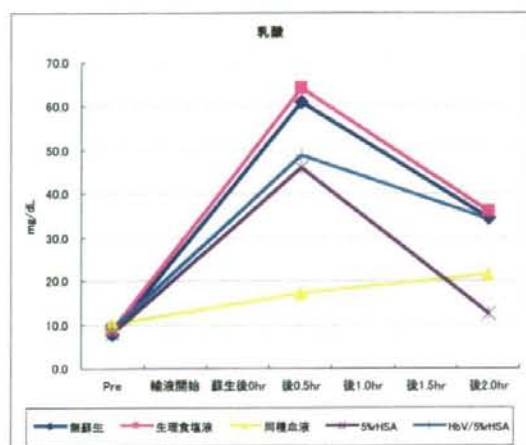
4. 乳酸値

血清乳酸値は出血を惹起後、輸血群をのぞいていずれの群でも30分で著しく高値をとり、2時間生存した動物では上昇が抑制されていた。

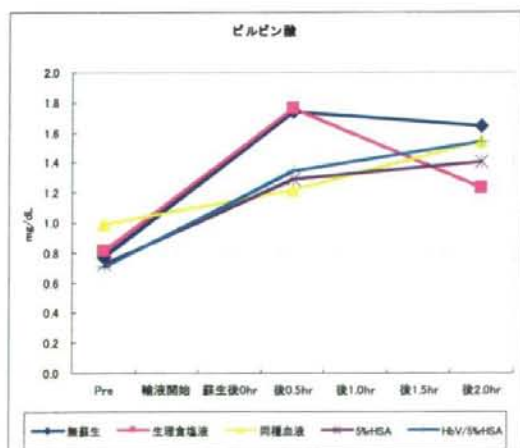
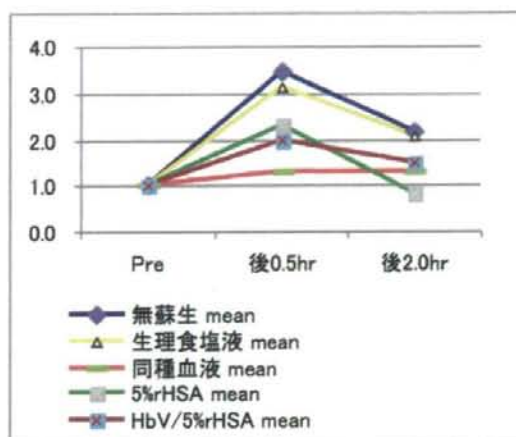
5. ビルビン酸値

ビルビン酸はショックからの蘇生後30分後に無

蘇生群で $1.7 \pm 0.4 \text{ mg/dl}$ 、生食群で $1.8 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ であったが、輸血群で $1.2 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ 、5%アルブミン生食群で $1.3 \pm 0.7 \text{ mg/dl}$ 、HbV群で $1.3 \pm 0.6 \text{ mg/dl}$ であり、生食群と輸血群との間に有意差を認めた。2時間経過してなお生存している固体から採決した血清中の値は $1.2 \sim 1.6 \text{ mg/dl}$ に固まっており、各群間に有意差は認められなかった。



において、蘇生30分後に輸血群と生食群の間に有意差を認めたのは輸血群では嫌気解糖系の亢進が抑制されていることを示している。また、有意差はないものの、HbV群、5%アルブミン生食群で乳酸・ピルビン酸値の上昇が抑制されたのも嫌気解糖の亢進が抑制されたことを示している。



D. 考察

血管損傷による制御不能出血では第1次施設では処置が困難で、第3次施設に移送する必要がある症例が含まれる。必ずしも外傷による出血だけではなく、消化管潰瘍からの出血や、食道静脈瘤の破裂などでも同様の事態が起こることが考えられる。

制御不能の出血によるショックの特徴は輸液を行っても血圧の回復が十分でなく、臓器機能を保持できなくなる可能性が高いことである。

現在出血性ショックの治療における初期輸液は生理的食塩水やLactate Ringerなどの晶質液であるが、制御不能出血を有する状態では大量の晶質液を用いた輸液蘇生を行っても予後が改善されないことが臨床検討でも動物実験でも明らかにされつつある。このような状況下で、膠質液を用いた輸液蘇生を行うか、人工酸素運搬体を含んだ湯液を用いて臓器機能を保持することが可能かについて

6. 乳酸・ピルビン酸比

乳酸ピルビン酸比はショックが進んで組織代謝が嫌気解糖に傾くと上昇し、酸素の供給があって、好氣的解糖が維持されるとピルビン酸濃度が上昇するので、ショックに於ける糖代謝を知るよい指標となっている。血管損傷による制御不能出血に

検討することとした。

制御不能出血はラット腹部大動脈を注射針で背側椎体まで貫通させることで一様な出血を惹起できるようにした。自由放血が持続するように小間膜や小腸を圧排し臓器の圧迫による出血の抑制を排除した。血圧が20mmHg以下となると、出血のスピードは少なくなり、凝血塊によって止血されるようであった。しかし、この凝血塊は血栓ではなく、120分生存個体においての観察では凝血塊は容易に取り除くことができ、凝血塊の隙間からの出血が認められる個体もあった。

このモデルを用いた蘇生の検討では、晶質液の大量投与では血圧の維持も困難で、出血量が多くなり、生存率も改善せず、制御不能出血による血圧低下には晶質液の輸液では蘇生効果が十分でないことが明らかとなった。2時間後に生存している個体のヘマトクリットは生食群、5%アルブミン生食群、HbV群で有意に低く、無蘇生群および輸血群は高値であった。

乳酸・ピルビン酸比は組織が嫌気代謝からどの程度回復しているかを知る指標であるが、30分後までは輸血群、HbV群で他の群に比して低値であり、無蘇生群との間に有意差を認めた。2時間後は生存個体が限られることと、蘇生は実験開始後20分までの間に終了しており、その後の輸液蘇生がなされていないことなどから、生存した個体の循環動態や組織の酸素代謝はいずれの群でも変わらない値となった。30分の時点でHb小胞体蘇生群における乳酸・ピルビン酸比の上昇が抑制されていることは、血圧が低く、灌流が悪い状況下でも組織の酸素代謝が維持されていたことを示すものと思われた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Yamamoto, Y. Izumi, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, M. Kohno, M. Watanabe, T. Adachi, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Systemic administration of hemoglobin vesicles elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J. Surg. Res.* 151, 48-54 (2009).
2. 須崎裕典、酒井宏水、小林直樹、池田達彦、堀之内宏久、小林 紘一、武田 朴、戸川 達男、土田英俊. 多波長パルス分光法を用いたHb小胞体用パルスオキシメータに関する研究. *人工血液* 16, 198-204 (2008).
3. H. Sakai, Y. Seishi, Y. Obata, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Fluid resuscitation with artificial oxygen carriers in hemorrhaged Rats: Profiles of Hb-vesicles degradation and hematopoiesis for 14 days. *Shock* 31, 192-200 (2009).
4. H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Histopathological changes of rat brain after direct injection of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. *J. Biomed. Materials Res. Part A* (in press).
5. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. *Shock* (in press).
6. K. Taguchi, T. Maruyama, Y. Iwao, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri. Pharmacokinetic analysis of hemoglobin vesicles for red blood cell substitution in a rat model

of hemorrhagic shock. *J. Controlled Release* (in press).

7. H. Horinouchi, H. Yamamoto, T. Komatsu, Y. Huang, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Enhanced radiation response of a solid tumor with the artificial oxygen carrier 'albumin-heme'. *Cancer Sci.* 99, 1274-1278 (2008).
8. X. Qu, T. Komatsu, T. Sato, O. Glatter, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Structure, photophysical property, and cytotoxicity of human serum albumin complexed with tris(dicarboxymethylene)[60]fullerene. *Bioconjugate Chem.* 19, 1556-1560 (2008).

(総説、著書など)

1. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers (Review paper). *Artif. Organs* 33, 139-145 (2009)
2. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier, that fulfills the physiological roles of the red blood cells structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* (in press).

2. 学会発表

1. 堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊、池田達彦、小林絃一 / (教育講演) 人工酸素運搬体の臨床応用へ向けた取組みと開発状況 / 第56回日本輸血・細胞治療学会総会 / 福岡国際会議場 / 4.25-28, 2008
2. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-Vesicle: A Cellular Hb-Based Oxygen Carrier that Fulfills the Physiological Roles

of the RBC Structure / ISOTT 2008 (International Society on Oxygen Transport to Tissue) / Sapporo Prince Hotel / August 3-7, 2008

3. T. Ikeda, H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-Vesicle: A Cellular Hb-Based Oxygen Carrier that Fulfills the Physiological Roles of the RBC Structure / ISOTT 2008 (International Society on Oxygen Transport to Tissue) / Sapporo Prince Hotel / August 3-7, 2008
4. 酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)のNO, COとの反応制御と新しい医療応用 / 第57回高分子討論会 / 大阪市立大学 杉本キャンパス / 2008.9.24-26
5. 池田達彦、堀之内宏久、井澤菜緒子、河野光智、泉陽太郎、渡辺真純、川村雅文、宗慶太郎、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存後の安全性の検討 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
6. 勢司泰久、堀之内宏久、相川直樹、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / 腎障害による制御不能出血モデルに対するヘモグロビン小胞体の蘇生効果 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
7. 堀之内宏久、勢司泰久、河野光智、泉陽太郎、酒井宏水、小林絃一、土田英俊 / 血管損傷による制御不要出血性ショックの蘇生 -人工酸素運搬体の効果について- / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23

8. 河野光智、竹田貴、堤恭介、池田達彦、泉陽太郎、渡辺真純、堀之内宏久、小林絃一、酒井宏水、土田英俊 / マウス肺切除 + 周術期出血モデルでのヘモグロビン小胞体投与の有効性の検討 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
9. 高橋大輔、藤原満博、東寛、宗慶太郎、酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊、池田久實 / ヘモグロビン小胞体(HbV)が免疫系に及ぼす影響 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
10. H. Azuma, H. Abe, D. Takahashi, M. Fujihara, H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, H. Ikeda / Transient induction of immune-suppressor cells in rat spleen by massive injection of hemoglobin-vesicle (HbV) / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
11. Y. Izumi, M. Yamamoto, K. Takeuchi, M. Watanabe, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Potential tumor oxygenation by systemic administration of hemoglobin vesicles in a mouse Lewis lung carcinoma model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
12. Y. Tomita, H. Toriumi, J. Tatarishvili, M. Tomita, M. Uekawa, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Horinouchi, K. Kobayashi, N. Suzuki. / Effect of artificial RBCs on murine hemorrhagic model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
13. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicles as O₂- and CO carriers / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
14. H. Sakai K. Sou, Y. Izumi, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-vesicle, a cellular Hb-based oxygen carrier, fulfills the physiological roles of the RBC structure. / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
15. Y. Izumi, H. Nagata, T. Yamada, H. Morisaki, H. Sakai, H. Horinouchi, J. Takeda, E. Tsuchida, K. Kobayashi / The effect of hemoglobin vesicle administration on ventilator induced lung injury / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
16. R. Aeiba, Y. Seishi, H. Horinouchi, M. Yamazaki, E. Tsuchida, H. Sakai, K. Kobayashi / Effect of artificial oxygen carrier Hb vesicle on cerebral blood flow during and after hemodiluted cardiopulmonary bypass in rat / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
17. Y. Seishi, H. Horinouchi, N. Aikawa, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Effect of HbV as a resuscitation fluid in uncontrolled hemorrhage shock model: blunt kidney injury model / The 6th

Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.

18. H. Horinouchi, Y. Seishi, M. Kohno, Y. Izumi, H. Sakai, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Resuscitation of hemorrhagic shock due to uncontrolled hemorrhage – effect of hemoglobin-vesicle in vascular injury model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.

19. 酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林絃一 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)とCOの反応性と細胞保護効果 / 第46回日本人工臓器学会大

会 / 東京 六本木アカデミーヒルズ40階 / 2008.11.27-29

20. 堀之内宏久 / 人工赤血球の出血性ショックへの応用 / 平成20年度研究成果発表会「人工血液をつくる(9)」 / 慶應義塾大学医学部 北里講堂 / 2009.2.11.

G. 知的財産権の出願。登録状況(予定を含む)
該当なし

分担研究報告書

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

分担課題：実質臓器損傷による制御不能出血に対するHb小胞体を用いた蘇生法の検討

研究分担者 小林 紘一 慶應義塾大学医学部外科 名誉教授/水町クリニック 院長
研究協力者 堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部呼吸器外科 准教授
勢司 泰久 慶應義塾大学総合医科学研究センター 助教

研究要旨

外傷における死亡の原因の中で失血死は大きな問題である。外傷現場で出血が十分に制御できないまま救急施設へ搬送することが多い現状では制御不能の出血によるショック症例に対してどのような蘇生を行うべきかを検討することは重大な意義がある。腹腔内臓器損傷に伴う制御不能出血モデルとして腎破裂モデルを作成し、交換輸血によってヘマトクリットを低下させ、制御不能出血モデルを作成、Hb小胞体、5%アルブミン生食、生理的食塩水、輸血を用いて蘇生効果と組織酸素代謝の変化をを検討した。その結果Hb小胞体を用いた蘇生群は死亡がなく、乳酸値の上昇も抑制され、一定の組成効果があるものと思われた。

A. 研究目的

Hb小胞体は赤血球代替物としての性格を有する人工酸素運搬体であり、出血性ショックの蘇生に有効であることを現在までの厚生労働省科学研究で示してきた。出血性ショックの治療は止血と輸液による循環動態の回復が主体となるが、受傷現場では十分な止血が不可能で、制御不能となる症例も存在する。このような症例に対する初期輸液法についてはまだ統一された見解がないのが実情である。

今回、腹腔内臓器の制御不能出血モデルとして新たに開発した腎損傷モデルを用いて、腹腔内出血制御不能症例の初期輸液にHb小胞体分散液を含む数種類の蘇生液を用い、組織酸素代謝および生存率にどのような変化が起こるかについて検討することを目的とした。

B. 方法

12週齢340gの雄性Wister ラットを用いた。エーテル麻酔後にセボフルレン2%の吸入麻酔とし、仰臥位で保温マットの上にテープで固定した。実験に用いるのカテーテル、計測器具を次のように留置した。蘇生液注入用としてSP45カテーテルを右外頸静脈に留置、脱血用カテーテルとして右頸動脈にSP45カテーテルを留置、血圧測定用カテーテルを左大腿動脈に留置、心電図モニターを四肢に固定、腹直筋にレーザードップラー血流計を挿入留置、および組織酸素分圧測定用の白金電極を腹部皮下に留置した。まずはじめに循環血液量と等量のHES（サリンヘス）で交換輸血を行い、ヘマトクリットを正常時の30%とした。この操作により、血圧は若干低下し安定した。

60分のインターバルを置いて状態が安定したところで、次に腎損傷は経皮的に左腎を腹壁近くに引き出して把持し、23G針を並べて作成した刺入器具を経皮的に刺入、皮膚まで貫通する。その後細

いワイヤーを23G心に刺入し、刺入器具を抜去する。ワイヤーを緊張させ、腹壁上からワイヤーに向かって手指で圧迫し、腎を損傷するとともに、後腹膜も損傷する。ワイヤーで腎を損傷した時点で実験の開始とした。

腎損傷の程度は血圧の変化で推定し、実験終了時に開腹して損傷の大きさを確認した。

30分以内に血圧が30mmHg以下となった個体に対し30mmHg以下となった時点から輸液による蘇生を開始した。

蘇生は血圧が40mmHgを超えた場合は輸液を停止し、35mmHg以下となった場合に輸液を再開した。輸液のスピードは56ml/kg/hrで行った。この量はひとでの輸液の際に実際に行われる最も早い輸液速度に対応している。

生存時間、出血量、循環動態諸標、呼吸数、皮下酸素分圧、腹直筋血流、血中乳酸値およびpHを経時的に測定した。

蘇生液として無蘇生群、5%アルブミン生食群(5%rHSA群)、Hb小胞体分散液群(HbV群)とした。



Fig. 1 腎損傷の作成方法



Fig. 2. 実験終了時の腎損傷の形態。腎破裂に近似の解消が惹起されていることが分かる。

C. 結果

生存率について、腎破裂による制御不能出血では無蘇生群、アルブミン生食群でそれぞれ60分後の生存率がそれぞれ37.5%、62.5%であったが、HbV群では死亡した個体はなく、生存率は100%であった。各群間には有意差はないが、HbV群は無蘇生群、5%アルブミン生食群に比して生存率が良好である傾向があった。(p=0.057)

