

200808005B

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 18 年度～20 年度 総合研究報告書

研究代表者

小林 紘一 (平成 18-19 年度)

堀之内 宏久 (平成 20 年度)

(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 18 年度～20 年度 総合研究報告書

研究代表者

小林 紘一 (平成 18-19 年度)

堀之内 宏久 (平成 20 年度)

(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 21 (2009) 年 4 月

目次

I. 総合研究報告書

1—156

小林 絃一 (慶應義塾大学 医学部 外科 名誉教授)

堀之内 宏久 (慶應義塾大学 医学部 外科 准教授)

- 1) Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体による蘇生および
中長期生存の評価 (小林 絃一) … 6
- 2) Hb小胞体の炎症性腸疾患治療への応用、
及びマウス肺切除周術期出血モデルでのHb小胞体投与 (堀之内 宏久) … 9
- 3) 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 (堀之内 宏久) … 12
- 4) 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 (小林 絃一) … 16
- 5) 人工酸素運搬体を用いた体外循環における
高次脳機能の保護に関する検討 (饗庭 了) … 20
- 6) Hb小胞体が免疫系に与える影響 (池田 久實) … 23
- 7) Hb小胞体の体内動態に関する検討 (小田切 優樹) … 31
- 8) 人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項に関する検討 (高折 益彦) … 39
- 9) Hb小胞体の開発指針の検討、および血液型判定に及ぼす影響の検討 (高折 益彦) … 40
- 10) Hb小胞体の臨床応用に関する検討 (高折益彦) … 41
- 11) Hb小胞体投与における血液検体検査の最適化 (村田 満) … 43
- 12) Hb小胞体の脳神経系への影響 (酒井 宏水) … 46
- 13) ラット血液希釈モデルによるHb小胞体/代用血漿剤系の安全性評価 (酒井 宏水) … 52
- 14) Hb小胞体の腸管機能に対する影響に関する検討 (土田 英俊) … 56
- 15) Hb小胞体によるマウス摘出腸灌流試験 (2) (土田 英俊) … 59
- 16) Hb小胞体による臍島保存条件の向上に関する検討 (土田 英俊) … 60
- 17) Hb小胞体による動物種依存型の疑似アレルギー反応に関する研究 (土田 英俊) … 61
- 18) リン脂質小胞体表面の陰性荷電と補体活性の関連 (土田 英俊) … 63
- 19) Hb小胞体/代用血漿剤分散系の粘弾性 (酒井 宏水) … 68
- 20) Hb小胞体/代用血漿剤分散系とその血液混合系の粘弾性 (酒井 宏水) … 76
- 21) Hb小胞体の分散安定度に寄与するPEG鎖の水和状態の解析 (土田 英俊) … 83
- 22) Hb小胞体の粒子サイズの精密評価、静的構造と拡散ダイナミクス (土田 英俊) … 86
- 23) 小角X線散乱法による高純度・高濃度Hbの分子間相互作用の解析 (土田 英俊) … 92
- 24) Hbをカプセル化することにより配位子結合が

	遅延されることの機序の解明 (酒井 宏水) … 96
25)	現行のHb小胞体のNO, CO反応性の検討 (酒井 宏水) … 108
26)	人工酸素運搬体のGMP製剤製造工程確立、製造・規格試験法設定 (山根 恒彦) … 116
27)	人工臓器としてのHb小胞体の臨床応用における安全性の評価 (高野 久輝) … 117
28)	試料の滅菌法の開発：超高压処理による滅菌法の可能性の検討 (高野 久輝) … 118
29)	Hb小胞体のGMP製剤製造方法の確立 (甲斐 俊哉) … 122
30)	研究発表 … 124
II.	研究成果の刊行に関する一覧 157 - 166
III.	研究成果の刊行物・別冊 167

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

研究代表者 小林 絢一 慶應義塾大学医学部 名誉教授 (平成18～19年度)
堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 准教授 (平成20年度)

研究要旨

本研究では、人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体(Hb小胞体)の臨床応用を目指し、物性の詳細な検討、血球との相互作用、正確な臨床検査法の開発、代謝と薬物動態、大量使用と免疫系へ与える影響、中・大動物での効果と安全性、体外循環での使用における効果、GMP製剤製造のための技術改良を行った。また、救急医療に従事する医師の人工酸素運搬体についての意識調査について検討を行った。それぞれ建設的な結果が得られ、免疫系の評価法や肺循環の評価に関して臨床応用時に注意すべき事項も明らかとなった。GMP製剤製造に遅れが出ており、平成20年度の臨床応用は困難となった。しかし輸血代替としての十分な機能と安全性は明確であり、今後取組むべき課題も明確となった。平成21年度以降も引き続き実現を目指し開発を促進する。

研究分担者

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
村田 満 慶應義塾大学医学部中央臨床検査部
教授 (H18-19)
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
山根 恒彦 ナジシエクス(株) 京都研究所 (H18-19)
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
(H20)

A. 研究目的

人工酸素運搬体を輸血代替として使用する場
合、血液の大半を置換するほどの大量投与を伴う
ことも想定される。従って赤血球輸血と同等以上
の酸素運搬機能を有することは当然として、安全
性が十分に担保されることが要件となる。我々が
開発中のヘモグロビン小胞体(HbV)は、現在まで行
ってきた*in vitro*, *in vivo*の検討から、これらの条件
を満たすと考えられる。

北米で開発されてきた修飾Hb溶液系は、非細胞
型に起因する様々な副作用に直面しており
(Natanson et al., JAMA 2008)、我々の細胞型HbVへ
の期待が高まっている。本研究では、HbVの臨床応
用を目標とし、HbVの物性的特徴の追求、中型動物
も対象とした生体適合性と大量投与時の効能・影
響の確認、また、均質な物質の製造法の確立を目的
としている。

具体的には、①HbVの物性値の手法による検討
(粒径分布/表面性状/膠質液中での挙動/NO, COガ

スの吸脱着)、②Hb小胞体を中型動物(ビーグル犬)で使用した際の効果と、中長期的安全性、③制御不能出血に対する蘇生液としての効果の確認、④周術期出血への利用法の検討、⑤健常時および出血性ショック時におけるHbVの体内動態、⑥リンパ組織での免疫応答に与える影響の検討、⑦脳神経組織への影響の検討、⑧Hb小胞体投与後の採血液の臨床検査を簡便に行う方法の確立、⑨血液型判定法への影響の検討、⑩体外循環での使用におけるHbVの安定性の検討、⑪摘出臓器の灌流液としての評価、⑫GMP製造技術の確立(脱CO化技術の開発、滅菌法の検討)、GLP技術によるHbV試料の安定的な作成と、⑬GMP製造への転換、以上を目的とした。

B. 研究方法

HbVの臨床応用を目指し、以下の方法で研究を行った。

- ① 最新の小角X線散乱法により、粒径とHbVの脂質膜の厚さ、内包Hb溶液の性状を評価した。膠質液に分散した際の粘弾性解析を行った。また、CO、NOの結合速度をStopped-flow rapid scan法にて測定し、修飾Hb溶液と比較した。
- ② HbVの生体適合性、特に肺循環への影響を検討するため、ビーグル犬にSwan-Ganzカテーテルを挿入、全血液量の50%を脱血しショック状態とし、蘇生後の右室機能の変化、血液ガス交換能、全身での酸素代謝、臓器機能を検討した。また、40%出血ショック・蘇生モデルを用い、1年間の観察を実施し、長期的な臓器への影響、成長への影響について検討した。
- ③ 制御不能出血モデルとして、i) ラットの腹部大動脈穿孔モデル、および ii) 腎破裂モデルを用い、HbVの生存延長効果について検討した。
- ④ 輸血頻度の高い周術期出血に対するHbVの使用について、マウス左肺全摘モデルを用いて検討し、保存血輸血群と比較した。
- ⑤ HbV中のHb及び脂質膜を各々¹²⁵I及び³H標識し¹²⁵I-HbVと³H-HbVを作製した。ラット全血液の40%を脱血してショック状態とし、標識HbVの投与(1400 mg Hb/kg bw)で蘇生した。体内動態(分布、代謝、排泄経路)を測定した。
- ⑥ WKAHラットに循環血液量の20%に相当するHbVを静脈内投与し、脾細胞を摘出した。免疫応答をConcanavalin A, KLHに対するT細胞の増殖反応から評価した。T細胞の活性化度は高親和性IL-2レセプターの産生を指標とした。HbVを捕捉する細胞の特定は、FITC標識小胞体を用い、脾細胞をフローサイトメーター上でゲートしその細胞表面マーカーを検討した。
- ⑦ ラット脳内出血モデルを用い、脳実質にHbVまたは赤血球を20 μL注入し、最長28日間生存させ、運動機能への影響を観察した。また、脳の病理学的検討によりHbVの分解・代謝、脳組織の修復過程を観察した。
- ⑧ 血液生化学検査に際し簡便なHbV除去法を開発するため、高分子量デキストランの添加でHbVを凝集分離する方法を検討した。干渉作用の有無からこの分離法の妥当性を検証した。
- ⑨ HbVを含有する血液が血液型判定に影響するかどうかについて明らかにするため、自動輸血検査器を用いた場合と、試験管法を検討した。
- ⑩ 小型体外循環回路にHbVを充填し90分の循環を行い、HbVの安定性を検討した。
- ⑪ マウスより小腸を摘出し、Hb小胞体を含有する液体で灌流し、小腸の蠕動運動と物質透過性を*ex vivo*評価した。
- ⑫ GMP製造に当たり、効率的に脱CO処理が可能となる大型モジュールを作成し、Hb小胞体の製造を実施した。また、5リットルスケールのGLP施設

で、HbVの安定的製造を実施した。また加圧による滅菌法を検討した。

⑬ GMP製造法の確立を目指し、各工程のバリデーションの確認と、手順書の作製を行った。

《倫理面への配慮》動物実験は、各研究機関内の動物実験センターあるいは研究等管理委員会にて承認を得た。HbVは期限切れの献血血液を原料として製造されているため、研究での使用、廃棄に当たって特段の注意を払った。

C. 研究結果および考察

① 小角X線散乱法により、均一粒径(238 ± 20 nm)、被覆層は一層(2分子膜)、内包Hb溶液が高濃度でも均一に存在し、機能が凝縮された微粒子分散系であることを実証した。膠質液に分散すると、静置状態で凝集するが、動的状態では分散し、粘度も低下した。HbVのNO結合速度は修飾Hb溶液に比較して遅延された。粒子内の濃厚Hb溶液にNO拡散障壁が形成された為であり、HbVが血管収縮を生起しない特徴が明確になった。他方、元来結合が遅いCOでは結合の遅延は無かった。

② ビーグル犬を使用した50%出血ショックモデルではHbVは有効な蘇生効果を呈した。投与直後に肺動脈圧の軽度の上昇を認めたが、蘇生効果、ガス交換能、血圧維持効果、臓器機能保持効果で、血液と同等の能力があることが明らかとなった。長期生存試験では、腹部臓器に物質の沈着や線維化を認めず、長期的にも安全であることが明らかとなった。

③ 二種類の制御不能出血モデルにおける蘇生液として、生存期間を延長する可能性があることが明らかとなった。

④ マウス左肺全摘モデルでの検討では、周術期輸血と同等の回復が認められた。

⑤ HbVはIntactな形で体内を循環し、主に肝脾に移

行し、代謝・分解された。Hbグロビン鎖分解物は尿中に、脂質成分は胆汁排泄を受け糞中に排泄された。出血性ショック時には血中半減期が減少したが、これは分布容積が増大したためと考えられた。この変化はHbVの効率的な末梢組織への分布増大に伴う見かけの血中半減期の減少であることが明らかとなった。

⑥ HbVの投与3日後まで非特異的Con-A刺激のみならず、KLH抗原に対する二次免疫応答が抑制された。しかし7日後には正常化し、一過性の反応と考えられた。HbV投与により脾臓内に免疫抑制細胞が誘導されると考えられる。増殖抑制効果はiNOSのinhibitorである程度解除された。MDSCと類似のマーカーを持つ細胞がリボソームを捕捉し、一過性に抑制活性を獲得し、免疫抑制効果が誘導されると推定された。

⑦ 脳内出血モデルより、HbVが血腫近傍組織に拡散するが分解消失し、組織修復も赤血球注入と同等であった。本モデルではHbV自体には神経学的影響は認められなかった。

⑧ 高分子量デキストランによるHbV凝集促進法を用いた分離操作手順を確立し、HbVの干渉作用を回避できる簡便な臨床検査が行えた。また、干渉が残る検査項目(リボ蛋白、トータルPAI-1, vWF活性のみ)が特定された。

⑨ 血液型の判定には手動判別では問題は無いが、自動検査法では裏試験で干渉が起こる可能性が示唆された。

⑩ 体外循環回路で循環させた後、HbVの粒径分布に著変は無く、また殆ど溶血しない事が明らかとなり、体外循環で安全に使用できる可能性が示唆された。

⑪ HbVによる小腸灌流試験により、小腸の粘膜機能、蠕動運動機能が2時間は保持することが可能であった。臓器保存液など新しい利用法の可能性が

明らかになった。

⑫ 脱CO化処理工程として、透析回路と光照射システムを組合わせた大型モジュールを構築、その評価を行い、HbVのGMP製造に適していると考えられた。また、超高压処理による滅菌法の可能性を明らかにした。

⑬ GMP製造設備はベンチャー企業(株)オキシジェニックス社と共同開発したが、資金面で困難が生じ開発を中断。計画に大幅な遅れを生じた。また、製造の最終工程である微粒子分散系の滅菌工程の改良が必要となった。

今後の課題としては、Hb小胞体の基本性能と安全性については、膨大な知見が得られており、一刻も早い臨床試験の開始が待たれている。GMP製剤製造法の課題の解決にも見通しがついており、着実な進展がある。人工酸素運搬体の実現が国民の

健康の増進に貢献することには何ら疑いは無い。

D. 結論

Hb小胞体は分子集合技術を駆使した高度技術の成果である。Hb小胞体(GLP試料)の物性評価、中動物まで対象とした投与試験等から、安全に大量投与できることが明確となり、GMP製剤製造と、非臨床試験・臨床試験の基礎資料を得ることができた。

GMP製剤製造では外的要因のため当初の計画から遅れが生じ、平成20年度内の臨床試験開始は困難となった。しかし輸血代替としての十分な機能と安全性は明確であり、今後取組むべき課題も明確となったので、平成21年度以降も引続き実現を目指し開発を促進する。

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
池田 達彦	慶應義塾大学医学部呼吸器外科 助教
泉 陽太郎	慶應義塾大学医学部呼吸器外科 助教
勢司 泰久	慶應義塾大学総合医科学研究センター 助教
小峰 梨沙	慶應義塾大学医学部内科
東 寛	北海道赤十字血液センター研究部 部長
藤原 満博	北海道赤十字血液センター研究部
高橋 大輔	北海道赤十字血液センター研究部
丸山 徹	熊本大学薬学部 医療薬剤学 教授
安楽 誠	熊本大学薬学部 助手
岩尾 康範	熊本大学薬学部 リサーチレジデント
三宅 誠司	大阪府済生会 野江病院検査科
武岡 真司	早稲田大学 先進理工学部 教授
宗 慶太郎	早稲田大学 理工学研究所 准教授
佐藤 高彰	信州大学 繊維学部 ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点 助教 (早稲田大学 理工学研究所 客員研究員)
藤堂 省	北海道大学大学院 医学研究科 第一外科 教授
M. Okamoto	Weill Medical College, Cornell University, Professor
S. Collins	Dept. of Gastroenterology, McMaster University, Professor
M. Intaglietta	Dept. of Bioengineering, University of California, San Diego, Professor
西田 誠司	ニプロ株式会社 医薬品研究所 製剤部 部長
片山 直久	ニプロ株式会社 医薬品研究所 製剤部 製剤第三研究室長
堀江 政雄	ニプロ株式会社 総合研究所 人工臓器開発センター 部長
山根 恒彦	ニプロ株式会社 医薬品研究所 製剤研究部 主席
岸田 晶夫	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 分子制御分野 教授

1. Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生および中長期生存の評価

A. 研究目的

Hb小胞体の臨床応用において安全性の評価は酸素運搬能と同様に静脈内投与されて効率よく酸素運搬を行い、末梢臓器の隅々まで酸素を効率よく運搬することを主眼におき開発され、これまでにその生体投与に関する有効性と安全性について様々な角度より検討がなされてきた。物質の製造は大学の研究室レベルでは大量製造を行うだけのスペースや人的資源を確保することが困難で、中型動物への投与を行うための試料を確保することが難しかった。平成16年度試料を外部の研究機関に委託製造し、GLPレベルの均質なHb小胞体を比較的大量に製造し供給できる体制が整い、中型動物での実験を行うことが可能となった。中動物での実験は臨床での使用を想定したモデルを作成し、中長期の安全性の評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

月齢6ヶ月のビーグル犬を用い、ケタラールで基礎麻酔を行い、気管内挿管を行った後、セボフルレン2%の吸入麻酔により全身麻酔とした。一回換気量を150 ml呼吸回数を15回として状態を安定させた。

右大腿動脈に動脈圧モニター用、および脱血用のカテーテルを挿入した。左前肢に静脈ラインをとり、薬物の投与経路とした。循環系諸標を測定するために日本光電社製 Laboratory Polygraph System D120Hを用いた。大脳皮質、腹直筋の組織血流内酸素飽和度をNIRA法 (Somanetics製、SPFB) により連続測定、記録した。

計測のための機器を装着し、状態が安定化した後に体重から次式 (循環血液量(ml))=86(ml/kg)×体重(kg) を用いて求めた循環血液量の40%相当量を20 ml/minの速度で脱血した。

脱血に従い血圧の低下を認め、50 mmHg以下と

なるのを確認した後、60分間にわたり収縮期血圧が50 mmHgを上回らないように維持した。50mmHgを上回るときには50 mmHg以下になるように脱血を行なった。

脱血ショック状態を1時間継続した後、脱血血液 (Autologus shed blood, ASB群)、Hb小胞体分散液 (Hb小胞体を5%アルブミン生食に分散した液体。Hb濃度は8.6 g/dl : Hb小胞体群) を用いて蘇生を行った。蘇生は20 ml/minの投与速度で上肢の静脈ラインより経静脈的に投与した。蘇生液投与後4時間、全身麻酔下に循環動態を確認した後に半覚醒の状態とし、自室へ戻した。以後1、3、7、14、28、56、84、168、365日目に体重、CBC、血液生化学を測定した。また28日目、168日目または365日目に犠牲死させ病理組織学的所見を検討した。また脱血前から蘇生液投与後4時間の間は血圧、心拍数、動脈血血液ガスを測定し循環動態の観察を行った。

犬では、脾臓が出血時に収縮し、脾臓内の血液が循環血液内に押し出され、血液の貯蔵庫としての機能を担っているとされる。脾臓の収縮の確認のため蘇生前後に経皮的に超音波にて脾臓のサイズを測定した。

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

自己血群はn=7 (365 days: n=3, 168 days: n=2, 28 days: n=2)で、HbV 群がn=9 (365 days: n=3, 168 days: n=3, 28 days: n=3)である。

体重の変化 (Fig.1)

図のように両群とも同様の経過が認められた。

WBC, Hb, Hct, Plt の変化 (Figs. 2, 3, 4, 5)

WBC においては両群とも同様の経過を認めた。Hb では HbV 群において Day1 に上昇したが自動血球計測装置を用いたための誤差と考えられた。その後は自己血群と同等な値に復した。Plt においては両群とも同様の経過を示した。

血液生化学所見の変化 (Fig. 6)

AST, ALT においては Day1 に出血性ショックの影響で一過性に上昇認めたがその後は脱血前の値に復した。T-Bil は HbV 群において Day1 から Day7 まで上昇を認めたがその後は同様な経過を示した。AMY は上昇傾向だったものの両群とも同様な経過を示した。LDH は Day7 にショックの影響と考えら

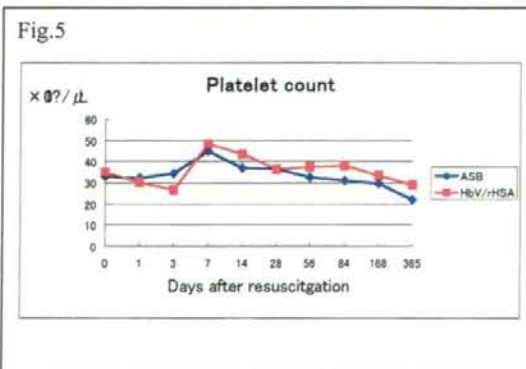
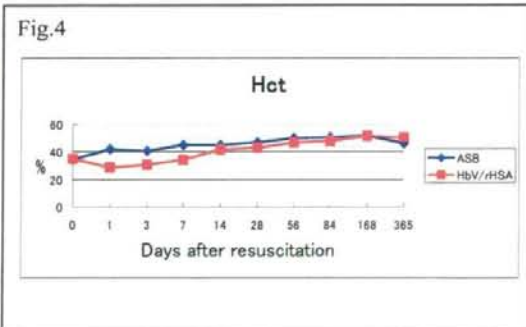
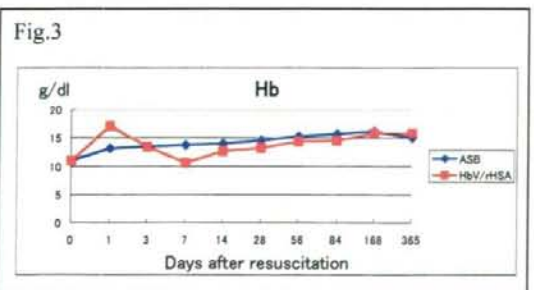
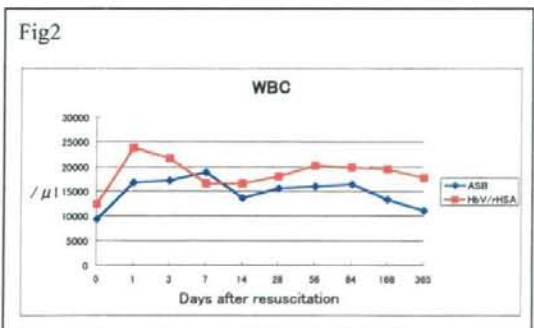
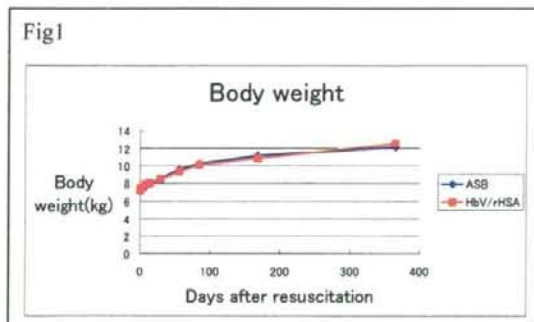
れる一過性的上昇を認めた。その後は同様の経過を示した。CPK は Day1 に出血性ショックの影響で一時的に上昇認めたがその後は脱血前の値に復した。TP, Alb は両群ともに低下認めなかった。T-Chol, TG とも HbV 群でやや高値を示したがほぼ同様の経過を示した。

脾臓サイズの変化 (Fig. 7)

左肋骨弓下より超音波にて脾臓を確認し、脾門部から下縁までの距離を超音波で計測した。脱血により脾臓は収縮することが確認された。脱血、蘇生前後で両群ともほぼ同様の経過を示した。

病理組織所見 (Table 1)

HbV/rHSA 群にて肝臓で Day28 に空胞変性と褐色色素沈着を認めた。脾臓で Day28 に褐色色素沈着を認めた。いずれも 168Days, 365Days のモデルでは認めず、一過性的変化と考えられた。



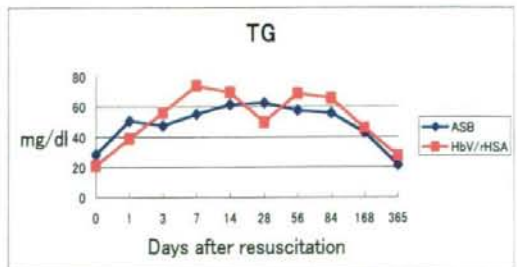
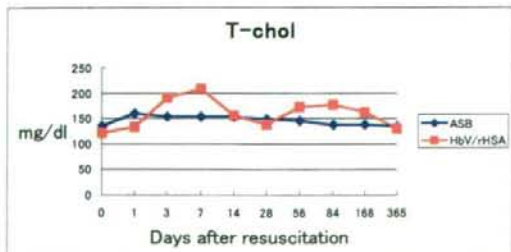
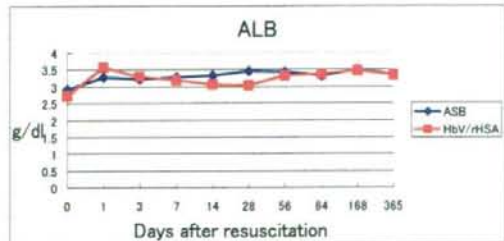
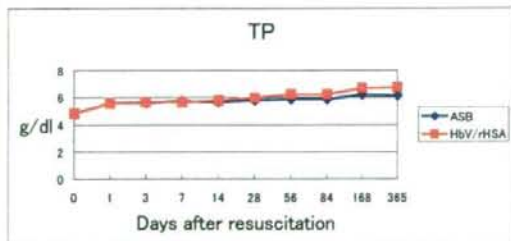
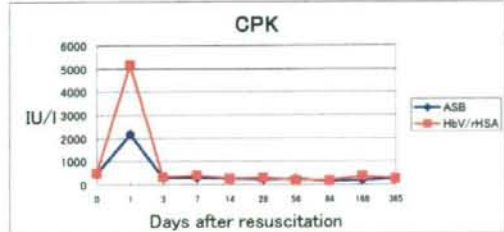
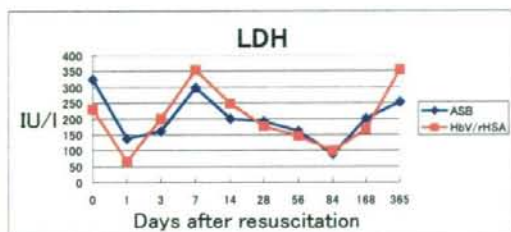
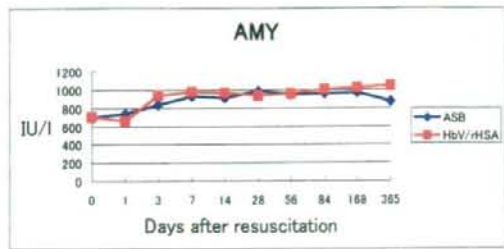
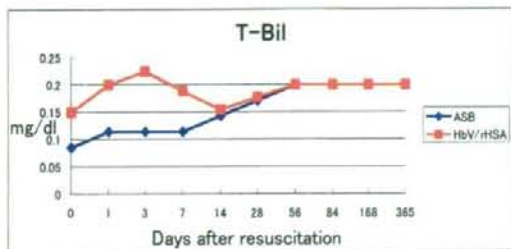
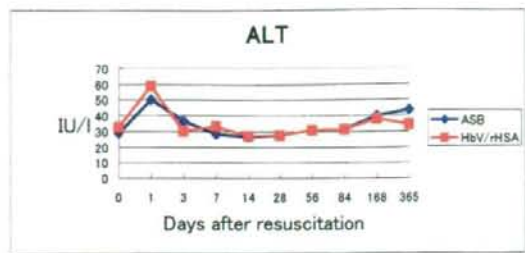
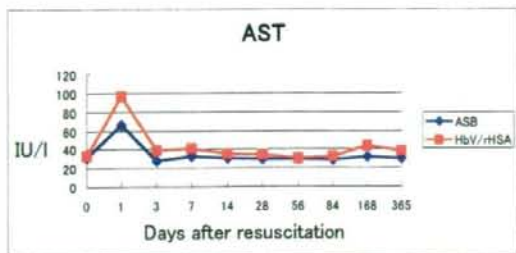


Fig.6

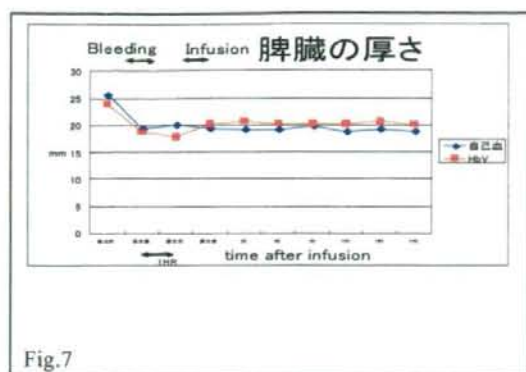


Fig.7

Table 1. Histopathological examination of organs.

Organ findings	ASB	HbV/rHSA
Cardiovascular		
Heart	NR	NR
Aorta	NR	NR
Urinary system		
Kidney		
Tubule, basophilic body	--~±	-
Lymphocyte infiltration	--~+	--~+
Brown pigment deposition	---~+	-
Testis		
Atrophy, (semiferous tubule)	--~±	-
Endocrine		
Adrenal gland	NR	NR
Digestive system		
Liver		
Cellular (infiltration, mononuclear cell)	--~+	-
Vacuolar formation	-	+(Day28)
Brown pigment deposition	-	+(Day28)
Esophagus and small intestine	NR	NR
Large intestine	NR	NR
Pancreas	NR	NR
Respiratory system		
Trachea	NR	NR
Lung pneumonia	-	--~+
Hematopoietic system		
Mesenteric lymph node	NR	NR
Thymus		
Atrophy	-	-
Spleen		
Hemorrhage, capsule	--~+	-
Brown pigment deposition	-	+(Day28)

D. 結論

Hb 小胞体を用いた脱血ショックモデルでの検討は小動物では種々のモデルで検討され、有効性と安全性が確認されているが、中大動物での検討はまだ行われていなかった。

一昨年度はビーグル犬を用いて脱血ショックモデルを作成し、Hb 小胞体の急性期の有効性と安全性を検討した。今回は中長期での安全性の確認のため、40%脱血ショックモデルを作成し長期生存をさせ、その経過観察中に全身状態、血液、血液生化学的検査を行い、比較検討した。また病理組織学的所見も検討した。いずれの所見においても HbV/rHSA 群は ASB 群とほぼ同様の経過を示した。長期生存モデルにおいても HbV は自己血と同様の安全性と有効性があるものと考えられた。

2. Hb小胞体の炎症性腸疾患治療への応用、及びマウス肺切除周術期出血モデルでのHb小胞体投与

A. 研究目的

大腸及び小腸の粘膜に慢性的炎症または潰瘍をひき起こす原因不明の疾患の総称を炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) という。通常、潰瘍性大腸炎とクローン病のことをさし、潰瘍性大腸炎もクローン病もともに特定疾患に指定されている。いずれもいまだ原因が不明であるために根本的な治療法がないのが現状である。これらの患者では病気の活動期に血便、下血により貧血が進むため、現在、赤血球輸血の対象となることが多い。将来的にヘモグロビン小胞体(HbV)の投与対象となることが予想されるが、まだ炎症性腸疾患による貧血に対するHbVの安全性及び有効性に関

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

また、輸血の頻度が高い待機手術へのHbVの応用に関しては、その研究は遅れている。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の安全性と効果とを検討した。

B. 研究方法

【実験1】

野生型C57BL/6マウス、雌性、8~10週齢を使用する。マウスに1.3% dextran sulfate sodium (DSS)を5日間経口投与すると下痢や血便を生じ、急性大腸炎を発症する。HbVは尾静脈から1回あたり20ml/kg注射する。DSSの投与開始日1日前より1日おきに6回HbVを投与する。比較対照として生理食塩水投与群(1回あたり20ml/kg)を作成する。HbVの投与終了後、2日目にマウスを犠牲死させる。それぞれ下記の項目を検討し、生理食塩水投与群(1回あたり20ml/kg)と比較する。大腸炎活動性指数 Disease Activity Index (DAI); 体重減少や下痢、血便の程度を評価する。体重減少は5段階、便の性状と血便は3段階でスコアをつけ、合計する。また大腸浮腫; 腸管重量/腸管長を算出し浮腫の程度を評価する。

【実験2】

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、肺動静脈とともに結紮後、切断し、左肺を切除した。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%濃度に溶解(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。Hb濃度は8.6g/dl(HbV+rHSA群)
4. 同種間の輸血群(ASB群:Autologus shedded blood)

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。

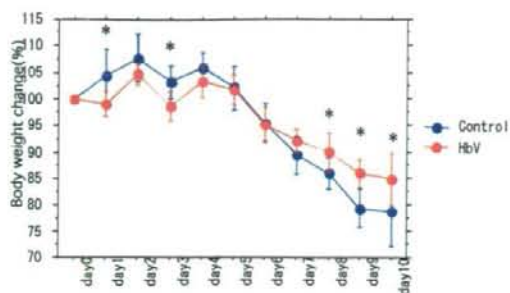
C. 結果

【実験1】

1. 体重変化

体重の減少はDSS投与後5日目以降から始まり、その後両群で減少し続けた。8日目以降、群間で有意差は認められた。DSS投与によるマウス急性大腸炎モデルにおいて、HbV投与群ではコントロール群と比較して後期の体重減少が抑制される傾向にあった。

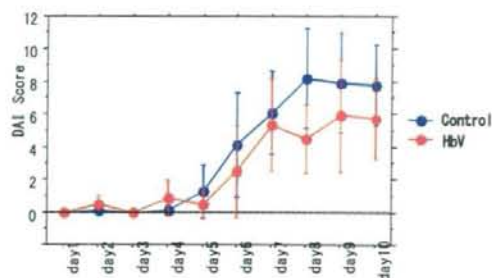
Figure 1



2. 大腸炎活動性指数 (DAI)

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

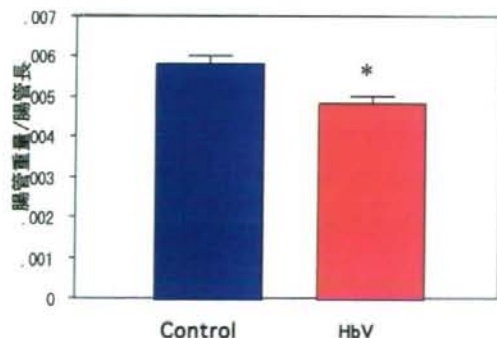
Figure 2



3. 大腸浮腫

HbV与群ではコントロール群と比較して改善される傾向にあった。

Figure 3

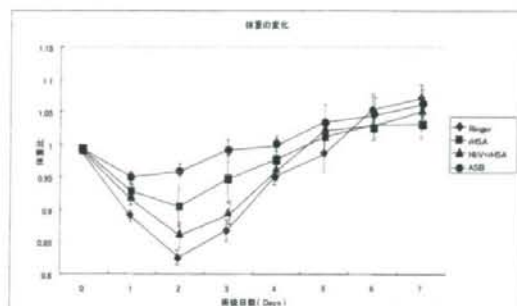


【実験 2】

1. 体重変化(Fig.4)

すべての群で術後 2 日で最も体重が減少し、その後増加した (図 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 群との間で有意差を認めた。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。

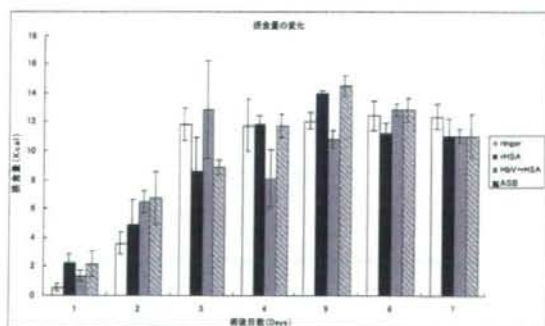
Figure 4



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、日数を追う毎に増加した。すべての群間で有意差は認めなかった。

Figure 5

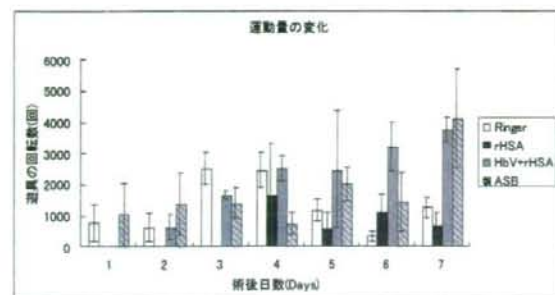


3. 自発運動量の変化

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、その後回復する傾向にあった。

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。すべての群間で有意差は認めなかった。

Figure 6



D. 考察

炎症性腸疾患による出血、貧血に対するHbV投与に関する検討は今までになされていなかった。実験1ではマウスを用いて大腸炎モデルを作成し、血便、下血を生じさせ、それによって進行する貧血に対するHbV投与の有効性と安全性を検討した。

DSS投与によるマウス急性大腸炎モデルにおいて、HbV投与群ではコントロール群と比較して大腸炎活動性指数DAIと体重減少が改善される傾向にあった。また大腸の浮腫も軽減されていた。

また実験2では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日目以降は同等に回復した。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。今回のモデルでは乳酸リンゲル液や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。

3. 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

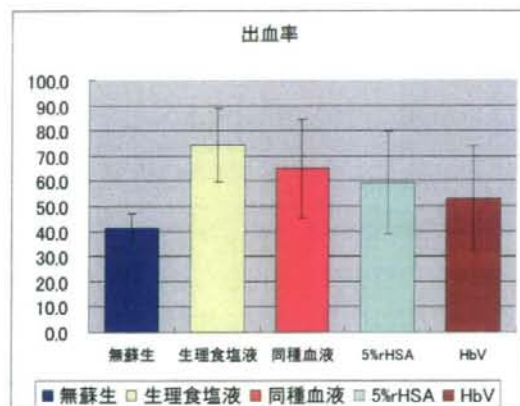
始後30分と2時間後に1mlの採血を行い、その後1ml生食を輸液した。

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±0.9ml、生食群で14.3±2.9ml、輸血群で12.6±4.1ml、5%アルブミン生食群で11.8±4.0ml、Hb小胞体群で9.8±3.7mlであった。



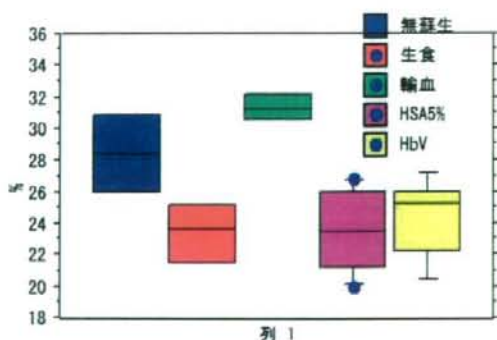
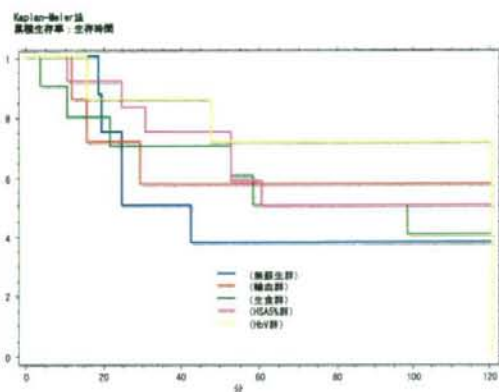
2. 生存時間

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。

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±3.4%)、生食群(23.3±2.4%)、5%アルブミン生食群(23.5±2.4%)、輸血群(31.4±1.3%)、HbV小胞体分散液群(24.2±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、 $0.42 \times (20-14) / 24 = 0.105$ 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。

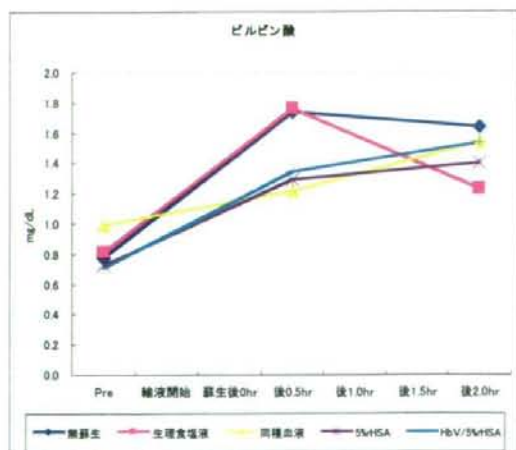
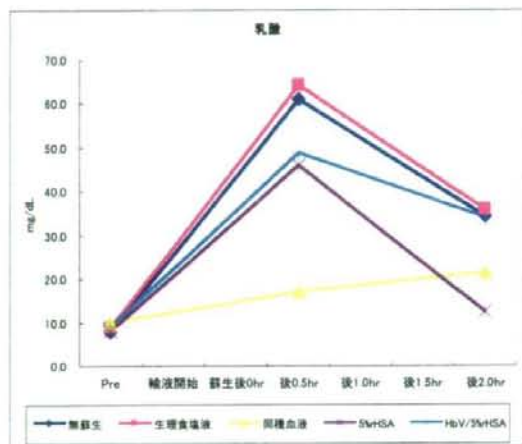


4. 乳酸値

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. ピルビン酸値

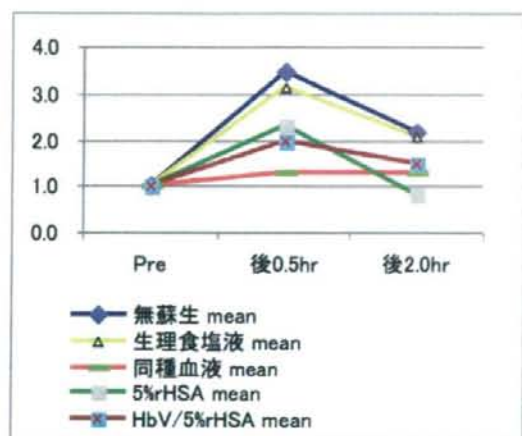
ピルビン酸はショックからの蘇生後30分後に無蘇生群で $1.7 \pm 0.4 \text{ mg/dl}$ 、生食群で $1.8 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ であったが、輸血群で $1.2 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ 、5%アルブミン生食群で $1.3 \pm 0.7 \text{ mg/dl}$ 、HbV群で $1.3 \pm 0.6 \text{ mg/dl}$ であり、生食群と輸血群との間に有意差を認めた。2時間経過してなお生存している固体から採決した血清中の値は $1.2 \sim 1.6 \text{ mg/dl}$ に固まっており、各群間に有意差は認められなかった。



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、酸素の供給があつて、

好氣的解糖が維持されるとビ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し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・ビ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分生存個体における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・ビ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・ビ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る。

4. 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

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