

Fig. 6, Time courses of plasma level of  $^{125}\text{I}$ -HbV at a dose of (A) 0.1 or (B) 1400 mg/kg. (first; open symbol, second; filled symbol)

## (2) 臓器分布

HbVの主要分布である肝臓における経時的分布推移の確認を行った。その結果、0.1 mg/kg投与時においては初回投与に比べ、2回目投与時において、投与直後に分布量の増大が確認された。一方、1400 mg/kg投与時においては初回投与・2回目投与間において分布推移の変化は確認されなかった。また、取り込みクリアランスを算出したところ、0.1 mg/kg投与時においては初回投与に比べ、2回目投与時には約9倍に増大していたが(3.5±0.4 and 29.6±18 mL/hr,  $p<0.01$ , for first and second injection, respectively)、1400 mg/kg投与時においては初回投

与・2回目投与時においては約1.5倍の増大であった(256±37 and 372±33 mL/hr,  $p<0.05$ , for first and second injection, respectively)。

次に、ABC現象の誘導に強く関与する脾臓における経時的分布推移の確認を行った。その結果、0.1、1400 mg/kg両投与時において、初回投与に比べ、2回目投与時において、分布量の増大が確認された。また、取り込みクリアランスを算出したところ、0.1 mg/kg投与時においては初回投与に比べ、2回目投与時には約4.5倍に増大していたが(1.6±0.1 and 7.2±3.2 mL/hr,  $p<0.01$ , for first and second injection, respectively)、1400 mg/kg投与時においては初回投与・2回目投与時においては約1.5倍の増大であった(51±6 and 71±19 mL/hr, no significantly, for first and second injection respectively)。

加えて、腎臓・心臓・肺においても同様の検討を行った結果、両投与時において、初回投与、2回目投与間に変化は確認されなかった。

## (3) 抗HbV IgG及びIgMの産生

ABC現象の誘導に強く関与する抗HbV IgMの産生は0.1及び1400 mg/kg両投与時において確認されたものの、その発現時期は異なり、それぞれ初回投与3日後及び7日後より有意に産生が確認された(Fig.7)。一方、抗HbV IgGの産生はいずれの投与群においても確認されなかった。

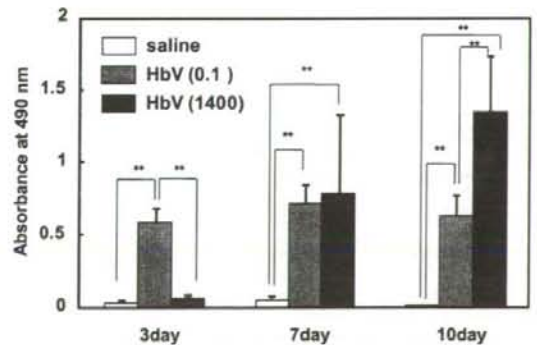


Fig.7, The quantitative of IgM against HbV 3, 7 and 10 days after HbV injection at a dose of 0.1 or 1400 mg/kg.

#### (4) 抗HbV IgMの認識部位

最後に、抗HbV IgMの認識部位の検討を行った。その結果、抗HbV IgMは1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-PEG (DSPE-PEG)に高い反応性を示した(Fig.8)。また、DSPE-PEGの挙動はFig.7に示した抗HbV IgMと同様の挙動を示したことから、抗HbV IgMはHbV脂質膜構成成分であるDSPE-PEGを特異的に認識していることが確認された

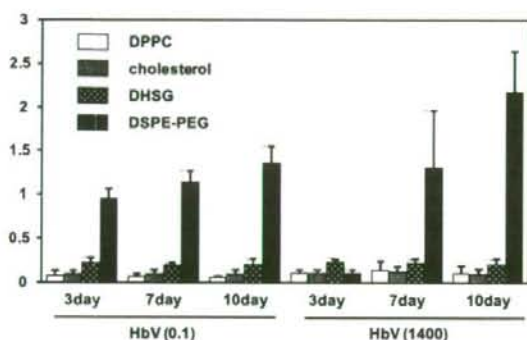


Fig. 8. The recognition site of IgM against HbV 3, 7 and 10 days after HbV injection at a dose of 0.1 or 1400 mg/kg. DPPC; 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine DHSG; 1,5-bis-*O*-hexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate

#### (5) 小括

また、HbVを現行の輸血システムで臨床使用を考えた場合、HbVの頻回投与は十分に考えられるため、ヘモグロビン小胞体(HbV)頻回投与時のABC現象誘導について健常マウスを用いて評価した。その結果、HbV 0.1 mg/kg投与時ではABC現象が誘導されたが、HbVの臨床使用推奨量である1400 mg/kg投与時では初回投与・2回目投与時の体内動態の変動は確認されなかった。これはHbV代謝経路である細網内皮系細胞(Kupffer cell及び脾臓マクロファージ)の飽和によるものと考えられる。加えて、ABC現象の誘導に強く関与する抗HbV IgMの産生量は、0.1及び1400 mg/kg両投与時において抗HbV IgMは産生されるものの、その発現時期が異なった。また、抗HbV IgMはHbV脂質膜中のDSPE-PEGを認

識していることが明らかとなった。

#### D. 総括

今回の検討により、HbV構成成分の分布・代謝・排泄経路を明らかにし、加えて、HbVの臨床適用である出血性ショック時における体内動態・健常時におけるHbV頻回投与時での体内動態を明らかにすることに成功した。

その結果、HbVは生体内で安定であり、かつ十分な代謝性を持ち、生体内蓄積がないことが明らかとなった。また、出血性ショック時においても十分な血中滞留性を保持していた。加えて、頻回投与時においてもHbVの臨床推奨投与量ではABC現象を誘導しないことが明らかとなった。

今回得られた知見は、HbVの体内動態は言うまでもなく、体内動態の観点からHbVの安全性も明らかとなった。今回得られた知見はHbVの体内動態における安全性を確認するとともに、今回の検討は、HbVが現行の輸血システムで用いられた場合を想定しており、臨床試験へ向けての有用な基礎資料になるものと考えられる。

#### E. 健康危険情報

該当なし

## 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

### A. 研究目的

1) “人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項”の完成を目指して日本血液代替物学会会員に作製した原案に対する意見、批判、同意を求める。

2) 国内、国外の人工酸素運搬体を研究し、開発している研究者、ならびに微小粒子の血液レオロジーの研究者に本研究班として追加検討すべき諸点への意見を求める。

3) 本研究班の研究者と協議し、研究方法、ならびに得られた成績の解釈、そしてさらなる研究課題、方法の検討を行う。

### B. 研究方法

1) “人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項”原案を血液代替物学会総会において会員全員に再度配布し意見を求めた。更に持ち回り理事会で最終的審議を行った。

2) 上記国内外の研究者に対し、それぞれの専門分野に応じた項目について、本研究班での成績(既発表論文、ならびに新しいデータ)を郵送し、方法論の妥当性、成績の解釈についての意見を求めた。

3) 研究班会議、血液代替物学会などの機会以外にも、共同研究者の所属する施設を訪問、実験装置の構成状況を検討、得られた生データを詳細に分析、検討した。

### C. 結果

1) 血液代替物学会会員からの意見で、また同学会持ち回り理事会でも語句の選択についての意見、助言があったが、基本的な内容に関する修正などは得られなかった。ただ、臨床で使用し得る人工

膠質液との反応性についての項においては、研究班で研究した結果と一部抵触する箇所が認められた。しかしその膠質液が未だわが国で使用されていない点、実験での使用濃度が臨床のそれよりも高濃度である点から臨床使用上では問題にならないと考え、修正は行わなかった。

2) 各研究者からの意見として、(1) 人工酸素運搬体(Hb小胞体: HbV)の血中滞留時間と、内包されるHbがメトヘモグロビンに変化する時間を如何に長くするか、(2) 細網内皮系への貪食を防止する対策、たとえば接着分子の抗体でのHbV表面修飾、(3) HbVが血液内で軸流となるようにそのサイズを大きくする試み、(4) 臨床使用には予期せざる出血への対応のみならず、希釈体外循環での人工心肺回路への充填も選択とする、などが主なものであった。

3) 研究班内の研究者との協議、研究計画への参加に関しては、(1) 臨床使用を目的としての安全性、有効性を検討するために希釈式自己血輸血モデルとした実験計画を作製した。(2) 各種人工膠質液との併用に伴うレオロジー的変化の観察計画を作製した。これらの討論、検討から前臨床試験で施行すべき諸点を補充することができた。

### D. 考察

1) “人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項”の作製は抽象的な表現に留まるのではその真意が得られない。しかし具体的に細部にわたり規制すれば今後の発展の妨げとなる可能性もある。従って、記載する諸項はあくまでも“基本的”であって、実際の使用にあたり、生体への臨床的影響が無ければ認容すべきではないかと考えた。

2) 国内外の研究者の意見として、HbVのような細胞型人工酸素運搬体に対する意見は高いことが示された。従って、今後は上記“研究成果”に述べ

た諸点について更なる基礎的研究を重ねる必要性を感じた。現段階でHbVでもその臨床的有用性、安全性は臨床使用に耐えられる故に、具体的な全身が必要と思われた。

3) 研究班内の各研究者と個々に討議することによってより具体的な事件計画の立案を行う事ができ、その意義が大きいことが認められた。

## E. 結論

現在開発中の人工酸素運搬体: HbVは、十分臨床使用に対応できるものであるので、速やかに次段階、即ち臨床治験第一相に前進すべきものと結論付けられた。

## 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

### A. 研究目的

1) 国内、国外の人工酸素運搬体を研究、開発に当たっている研究者、ならびに血液レオロジーの研究者に、今までに得られたHbVの血管内動態に関するデータを提示し、追加検討すべき諸点への意見を求める。

2) 本研究班の研究者と、研究方法ならびに得られた成績の解釈、更なる研究課題、方法の検討を行う。

3) 人工酸素運搬体(HbV)を患者に使用することを想定し、血液型判定においてHbVの混入の影響を検討する。

### B. 方法

1) 上記国内外の研究者に対し、それぞれの専門分野に対応した項目について、本研究班での成績(既発表論文、ならびに未発表成果)を郵送し、方法論、結果の妥当性、成績の解釈についての意見を求めた。

2) 研究班会議、血液代替物学会などの機会以外にも、共同研究者の所属する施設を訪問、実験などから得られたそのままのデータを詳細に分析、検討した。

3) 医療機関の倫理委員会の承認が得られた研究協力者から得たA、B、O、AB型それぞれの血液とHbVを0%から1、2、5、10、20、30、40%の割合に混合、それぞれについて試験管法、および自動血液型判定を、おもて試験、及びうら試験で行い、両方法の適合性を検討した。

### C. 研究結果

1) 各研究者からの意見としては、i) HbVの血液中滞留時間と、内包するヘモグロビン(Hb)のメトヘモグロビン化を如何に長くするかを指摘、ii) 細網内皮系への貪食を防止する対策(例えばHbVへの接着分子抗体の配合)、iii) HbVが血液内で軸流を呈するようにそのサイズを大きくする試み、iv) 臨床使用には予期せざる出血への対応のみならず、希釈体外循環での人工心肺回路への充填を第一選択とすること、等がその主なものであった。

2) 研究班内の研究者との討議、研究計画への参加に関しては、i) 臨床使用を目的としてのHbVの安全性、有効性を検討するために希釈式自己血輸血での利用をモデルとした実験計画を作製した。ii) 各種人工膠質との併用に伴うレオロジー変化の観察計画を作製した。これらの討論、検討から、前臨床試験で実施すべき諸点を補充することができた。

## 10. Hb小胞体の臨床応用に関する検討

3) おもて試験においては、40%までのHbV混入では試験管法、自動血液型判定器いずれを用いても判定は可能であった。また特定の血液型での判定においても影響は認められなかった。うら試験において自動血液型判定器を用いた場合、5%までのHbV混入で判定可能であった。試験管法においても20%以上の混入では判定に困難を感じた。

### D. 考察

1) 国内外の研究者の意見として、HbVのような細胞型人工酸素運搬体に対する評価は高いことが示された。従って、今後は上記“研究結果”に述べた諸点について更なる基礎的研究を重ねる必要性を感じた。現段階での製品でもその有用性、安全性は臨床使用を満足させると思われる故に、製造面での充実が必要と思われた。

2) 研究班内の各研究者と個々に討論することによって、より具体的な研究計画の立案を行う事ができ、その意義が大きいことが認められた。

3) HbVを既に投与された患者を想定したABO型判定では、上記のいずれの方法も使用できることが示された。しかし、輸血用血液の適合性を確認する場合、自動血液型判定器を用いた場合には、5%以下のHbV混入例においてのみ可能で、それ以上の混入の場合には不可能であることが明らかになった。また、試験管法でも判定に困難を伴うことが認められた。

### E. 結論

現在開発中の人工酸素運搬体HbVは、十分臨床使用に対応できるものであるので、速やかに次段階、すなわち臨床治験第一相に前進すべきものと結論付けられた。また、HbV使用患者での輸血用適合液の選択には、細心の注意が必要である。

### A. 研究目的

1) 国内、国外の人工酸素運搬体を研究・開発を行っている研究者、ならびに血液レオロジーの研究者に今までに得られたリボソーム内包Hb酸素運搬体(HbV)に関する研究成果を提示し、追加試験すべき諸点への意見を求める。

2) 本研究班の研究者と協議し、研究課題、研究方法、ならびに得られた成績、その解釈の検討を行う。

3) HbVを使用した患者の血液中の電解質測定において従来使用している電極法、ならびに最近使用頻度が高くなってきているドライ化学法との比較検討を行う。

### B. 方法

1) 国内外の研究者に対し、それぞれの専門分野に応じた項目について、本研究班での成績(既発表論文、ならびに未発表成果)を郵送し、方法論の妥当性、成績の解釈についての意見を求めた。

2) 研究班会議、学会などの機会以外にも、共同研究者が所属する施設を訪問、実験などから得られたそのままのデータを詳細に分析、検討した。

3) HbV原液の $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ イオン濃度をドライケミストリー法(ピトロス 250:V法)と、従来の電極法(TBA-200FR NEO:T法)とで測定するとともに、医療機関の倫理委員会の承認が得られた研究協力者からの血液に、HbV濃度が40%となるように混合、その血漿内の $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ イオン濃度を測定、両者の測定値を比較した。

### C. 研究結果

1) 各研究者からの意見として、(1) HbVの血液中滞留時間と内包されるヘモグロビン(Hb)のメトヘモグロビン化をいかに長く防止するかの指摘、(2) 細網内皮系への貪食を防止する方策、(3) HbVが血液内で軸流を呈するように粒子サイズを大きくす

る試み、(4) 臨床使用には予期せざる出血への対応のみならず、希釈体外循環での人工心肺回路への充填を選択とすること、などが得られた。

2) 研究班内の研究者との討論、研究計画への参加に関しては、(1) 臨床使用を目的としてのHbVの安全性、有効性を検討するために、希釈式自己血輸血をモデルとした実験計画を作製した。(2) 各種人工膠質液との併用ともなうレオロジー変化の観察計画を作製した。これらの検討から、全臨床試験で施行すべき諸点を補充した。

3) HbV、すなわちHbV粒子浮遊生理食塩液を、V法で測定した場合には、製造証明書にある数値に近い $153 \pm 1.3$  mEq/Lなる $\text{Na}^+$ の値を得たが、T法にて測定した場合には、 $104.3 \pm 1.7$  mEq/Lなる値を得た。また、 $\text{Cl}^-$ 値についてはV法でも予想値より約13 mEq/L低値の $141 \pm 1.0$  mEq/Lなる値を得た。一方、T法では約40 mEq/L低い $102.5 \pm 0.6$  mEq/Lなる値を得た。

さらに、研究協力者から得られた血液( $\text{Na}^+ = 150 \pm 2.3$  mEq/L,  $\text{Cl}^- = 110 \pm 2.0$  Eq/L)にHbVを40%混合になるように添加したものの、 $\text{Na}^+$ 濃度はV法では $148.4 \pm 4.8$  mEq/Lなる値を得たが、T法では $129.8 \pm 5.7$  mEq/Lなる値を得た。一方、 $\text{Cl}^-$ についてはV法での測定では測定不能との表示を得た。しかしT法では $108.7 \pm 3.8$  mEq/Lと予測値に近い値を得た。

#### D. 考察

1) 国内外の研究者からはHbVのような細胞型人工酸素運搬体に対する評価が高いことが示されたので、今後はさらなる基礎的研究を補足する必要性を感じた。

2) 研究班の研究者と個々に討論することによって、より具体的な実験計画の立案を行うことができ、その意義が大きいことが認められた。

3) 血清電解質濃度測定には、従来の電極法を用いても、近年開発されたドライケミストリー法を用いても、HbVが血液に混合された場合には、何らかの方法でHbV粒子を除去しない限り測定できないことが認められた。またどの程度の混合までは測定可能か検討する必要性が認められた。

#### E. 結論

現在開発中の人工酸素運搬体: HbVは、十分に臨床使用に対応できるものと判断されるので、速やかに臨床試験第一相に進むべきものと思われた。また、HbVを使用した症例から得られた血液の電解質測定は、従来の電極法 (TBA-200FR NEO)、あるいは最近開発されたドライケミストリー法 (ピトロス 250) では測定できないことが認められた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

## 11. Hb小胞体投与における血液検体検査の最適化

### A. 研究目的

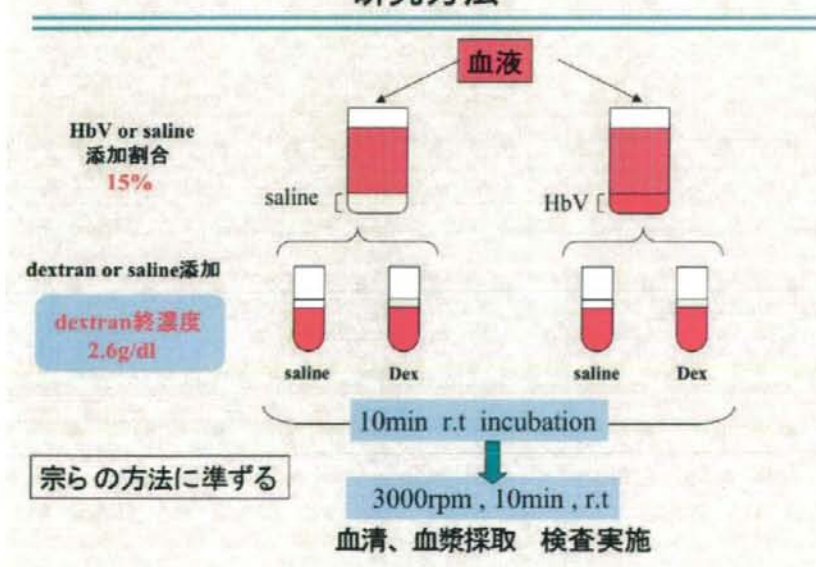
本研究は、血液代替物の安全性評価を目的とし、Hb小胞体(HbV)投与時におこりうる、さまざまな生体反応を臨床検査値の変化として捉える方法を探索している。動物実験を行う過程でHb小胞体そのものが検査測定値に影響することが判明した。HbVの粒子径は250nmと非常に小さいため、ヒト血液中にHbVが存在している場合、通常臨床検査で行われている遠心分離条件により得られる血清または血漿中にはHbVが浮遊している。さらに血清または血漿中のHbVは検査測定系への干渉作用があることがこれまでの検討により明らかとなっている。これは治験を実施する際の一つの問題点となりうる。従って具体的な臨床検査法の標準化との実施プロトコルの作成が急務と思われる。これまでの研究で、HbVを血漿や血清から完全に除去することは困難であるが、(1) 超遠心法では大部分が除去可能であるが一部除去が不完全となること、一方で

超遠心は煩雑で一般の検査ラボに不向きなこと、血清や血漿中のある成分を沈殿させてしまうなどの問題点も明らかになった。また(2) フィルター処理の問題点としては中性脂肪、凝固因子等がトラップされてしまうことが指摘された。そこでHbV混合血液の検査の最適化を行うため、HbVを高分子凝集剤(デキストラン)を用いて簡便に除去する方法を採用し、臨床への有用性を検討した。

### B. 研究方法

高分子量のデキストラン(400~500kDa)をHbV分散液に添加することによりHbVは凝集し遠心分離により沈降が可能となる。この原理を応用しデキストランによるHbV除去の効果を調べた。

## 研究方法



### C. 結果および考察

凝固学的検査の結果をTable 1に、また生化学的検査の結果をTable 2にまとめた。

HbVの分離操作をしない場合の検体では、凝固線溶検査ではATⅢで上昇傾向、トータルPAI-1で低下傾向を示し、その他FDP、D-ダイマーを除くすべての検査で測定不能と判断された。生化学検査においては総タンパク、アルブミン、LDH、CK、クレアチニン、CRP、ハプトグロビンの上昇が見られた。また、総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロール、リン脂質ではHbVの脂質膜が影響し上昇した。低下傾向を示した項目はChE、尿素窒素、IgMであった。総ビリルビン、AST、ALT、 $\gamma$ GTにおいては検査不能と判断された。免疫学検査項目であるHBs抗原・抗体、HCV抗体いずれもHbVによる影響は認められなかった。

一方、HbV浮遊血液にデキストランを添加し遠心分離で除去した血清、血漿はHbVの干渉作用は見られず生食添加条件とほぼ同様な検査値となった。この結果

はデキストランがHbVを除去していることを示す。しかし、デキストランの影響により生化学検査ではリポプロテイン(a)の低下、凝固検査ではvWF活性の低下、トータルPAI-1の上昇が見られた。リポプロテイン(a)の低下はデキストランの凝集作用によるものと考えられる。vWF活性の低下、トータルPAI-1の上昇の原因については今後、調査の必要があると思われた。

### D. 結論

血液中のHbVをデキストランにより除去することによってその血清、血漿は一部の検査を除きHbVの影響を受けることなく測定可能であった。今後、病的サンプル(血液)を用いて同様な検討を行うとともに実臨床でのデキストラン使用に関するプロトコールを作成する必要がある。

### E. 健康危険情報

該当なし

Table 1. 凝固学的検査

| 項目                | HbVの影響 | DEXのHbV除去効果 | DEXの影響 | 原理               |
|-------------------|--------|-------------|--------|------------------|
| 活性トロンボラスチン (APTT) | 測定不能   | あり          | なし     | Langdell法(散乱光度法) |
| プロトロンビン(PT)       | 測定不能   | あり          | なし     | Quick一段法(散乱光度法)  |
| フィブリノゲン           | 測定不能   | あり          | なし     | 発色性合成基質法         |
| アンチトロンビンⅢ(ATⅢ)    | 上昇傾向   | あり          | なし     | LPPIA            |
| vWF抗原             | 測定不能   | あり          | なし     | トロンビン凝固時間法       |
| vWF活性             | 測定不能   | なし          | 低下傾向   | ラテックス凝集反応        |
| トータルPAI-1         | 低下傾向   | —           | 上昇傾向   | 固定血小板凝集法         |
| FDP               | なし     | —           | なし     | ラテックス免疫比濁法       |
| D-ダイマー            | ?      |             |        | ラテックス免疫比濁法       |



Table 2. 生化学的検査

| 項目           | HbV の影響 | DEX の<br>HbV 除去<br>効果 | DEX の影響 | 測定原理                          |
|--------------|---------|-----------------------|---------|-------------------------------|
| 総タンパク        | 上昇傾向 平均 | あり                    | なし      | Biuret 法                      |
| アルブミン        | 上昇傾向    | あり                    | なし      | BCG 法                         |
| 総ビリルビン       | 測定不能    | あり                    | なし      | バナジン酸酸化法                      |
| AST          | 測定不能    | あり                    | なし      | JSCC 標準化対応法                   |
| ALT          | 測定不能    | あり                    | なし      | JSCC 標準化対応法                   |
| γGTP         | 測定不能    | あり                    | なし      | JSCC 標準化対応法                   |
| LDH          | 上昇傾向    | あり                    | なし      | JSCC 標準化対応法                   |
| LAP          | なし      | —                     | なし      | 酵素法(L-Leu-DBHA 基質)            |
| CK           | 上昇傾向    | あり                    | なし      | JSCC 標準化対応法                   |
| ChE          | 低下傾向    |                       |         | Rate assay(P-ヒドロキシベンゾイルコリン基質) |
| 尿素窒素         | 低下傾向    | あり                    | なし      | ウレアーゼ UV 法                    |
| クレアチニン       | 上昇傾向    | あり                    | なし      | 酵素法                           |
| 尿酸           | ?       |                       |         | ウリカーゼ POD 法                   |
| 総コレステロール     | 上昇傾向    | あり                    | なし      | 酵素法                           |
| エステル型コレステロール | 上昇傾向    | あり                    | なし      | 酵素法                           |
| 遊離型コレステロール   | 上昇傾向    | あり                    | なし      | 酵素法                           |
| トリグリセライド     | なし      | —                     | なし      | LA(ラテックス凝集比濁法)                |
| リン脂質         | 上昇傾向    | あり                    | なし      | 酵素法(遊離グリセロール消去法)              |
| 遊離脂肪酸        | なし      | —                     | なし      | 酵素法                           |
| HDL-C 定量     | なし      | —                     | なし      | 酵素法                           |
| リポ蛋白質        | なし      | —                     | 低下傾向    | 選択阻害法(直接法)                    |
| カリウム         | なし      | —                     | なし      | 電極法                           |
| カルシウム        | なし      | —                     | なし      | OCPC 法                        |
| 無機リン         | なし      | —                     | なし      | モリブデン酸直接法                     |
| フェリチン        | なし      | —                     | なし      | CLEIA                         |
| ハプトグロビン      | 上昇傾向    | あり                    | なし      | ネフェロメトリー                      |
| IgG          | ?       |                       |         | TIA                           |
| IgM          | 低下傾向    | あり                    | なし      | TIA                           |
| HBs 抗原       | なし      | —                     | なし      | CLIA                          |
| HBs 抗体       | なし      | —                     | なし      | CLIA                          |
| HCV 抗体       | なし      | —                     | なし      | RIA 固相法(IRMA)                 |

## 1.2. Hb小胞体(HbV)の脳神経組織への影響

### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)は、赤血球と同等の酸素運搬機能を有し、細網内皮系での捕捉代謝過程で一過性変化を認める他は、特に顕著な副作用が無いことを齧歯類、ビーグルへの投与試験により確認してきた。しかし脳神経系への影響に関する解析は報告例が十分とは言えない。脳では通常、血液脳関門(BBB)が血液成分と脳組織間を遮蔽しているため、HbV投与の場合、これが直接に脳組織と接触はしない。しかし脳内出血や頭部外傷などの場合には、血液成分だけでなくHbVが脳組織に接触するため、マクロファージがHbVを処理する過程があり得る。この場合赤血球とHbV由来のHbおよび鉄の毒性が出現すると想定されるが、その過程は赤血球と同等と予想される。しかしHbVの脂質膜は赤血球膜とは異なる成分が含まれるので、異なる作用を示す可能性もある。また、損傷した組織が修復される過程で、HbVおよびその分解成分がもたらす影響も調べる必要がある。米国で展開された分子内架橋Hb(DCLHb)の臨床試験では、脳内出血患者への投与例で死亡率が上昇したとの報告もあり、脳組織に与える影響の考察は重要課題である。本研究で

はBBBが破壊されHbVが直接的に脳神経細胞に接触することを想定し、脳内出血モデルとしてHbVをラット脳実質に直接注入した。その後の行動学および組織病理学的変化を長期間観察し、脳神経細胞への影響とHbVの代謝過程の解明を目的とした。

本研究は、Prof. Michiko Okamoto (Department of Pharmacology, Weill Medical College of Cornell Univ.)との共同研究として実施した。

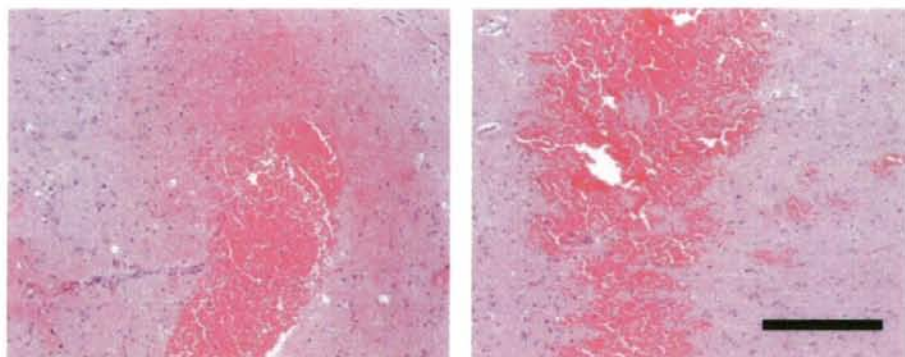
### B. 方法

#### 1. 試料調製

HbVは、5%rHSA溶液に分散させ、[Hb] = 8.6 g/dLとした(HbV/rHSA)。また、1.5%濃度Sevoflurene麻酔下、雄性Wistar系ラットの腹部下大静脈からヘパリンを添加シリンジで採取した新鮮血を生理食塩水で洗浄し、RBCを5%rHSAに分散させ、Hb濃度を合わせた(RBC/rHSA)。

#### 2. 動物実験

1.5%濃度Sevoflurene麻酔下、雄性Wistar系ラットをstereotaxic frameに固定し、頭部の毛剃後、皮膚に70% ethanol及びイソジンを塗布し



**Fig. 1.** Hematoxylin/eosin staining of rat brain showing the presence of hematoma one day after injection. (Left) The HbV group showed the red colored area in the parenchymal region, indicating the presence of dispersed HbV. (Right) The RBC group showed that most of the RBCs remained in the hematoma. Scale bar, 200  $\mu$ m.

殺菌処理した。皮膚および筋組織を切開し、頭骸骨上bregmaを確認、caudate nucleusに値する位置(4 mm lateral to midline)に1mm径の孔を開け、注射針を右尾状核固定位置まで挿入させた(coordinates: 2.4mm anterior, 2.4 mm lateral to bregma and 6.5 mm venta from the surface)。試料溶液(HbV/rHSA, rRBC/rHSA) 20  $\mu$ lを、マイクロシリンジを用い注入速度4  $\mu$ L/minで注入投与した。3分間放置後、針を除去しGelformを孔に入れて孔膜を閉じ、脳脊髄液の漏出を抑えた。ドリル孔は歯科用セメント(トクヤマ イオノタイト)で埋めた。皮膚組織を縫合、抗生物質セフメタゾン及び鎮痛剤レベタンを投与した。1, 3, 7, 14, 28日後に麻酔安楽死後、脳を摘出し、直ちに10%ホルマリン或は2.5%グルタルアルデヒドで固定した。ホルマリン固定した組織はH/E染色、Berlin blue染色、免疫抗体染色として抗ヒトHb抗体染色と、アストロサイト(星状細胞)のglial fibrillary acidic protein (GFAP)抗体染色(慶大医病理学科、池田栄二先生の協力)、抗ヘムオキシゲナーゼ-1染色(組織科学研究所)などを実施した。グルタルアルデヒドで固定した脳は、穿孔部位近傍のみを数ミリ角に切り、グルコース溶液に入れて保存、BML社に提出し透過型電子顕微鏡写真を撮影した。また、注入後1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28日後に、体重測定のほか、回復後の行動観察を行い、次の項目の運動機能について検討した。

- i) 驚愕反応(顔面に空気を吹付けた際の反応)、
- ii) 立毛、
- iii) 歩行能力(1.5cm幅の角材上の歩行)、
- iv) 前足での吊下り能力(4mm幅の棒に吊り下がる時間)

### C. 結果

ラットは全例が生存した。注入1日後に僅かに体重の減少が見られたが、その後は増大した。特に群間に相違は認められなかった。本年度は7日後までの変化についてまとめた。

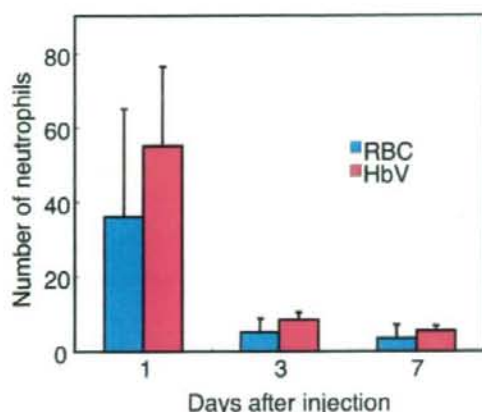


Fig. 2. Hematoxylin/eosin staining of rat brain showed the presence of neutrophils surrounding the hematoma due to the inflammatory reactions. The numbers of neutrophils were the highest at one day after injection, and they decreased significantly 3 days after injection.

### 1. 行動学的評価

評価項目のうち、立毛、驚愕反応、1.5 cm幅の梁上の歩行能力に異常が認められるラットがHbV群、RBC群に認めたが、有意な相違はなかった。また、4 mm幅の棒に前足で吊下がる時間を計測したところ、処置前は14秒程度であるが注入翌日に8-10秒程度に短くなるが、その後の回復はHbV注入群の方が速い傾向が認められた。しかし、有意な差ではなかった。

### 2. 組織病理学的検討

1日後のH/E染色では、HbV群、RBC群ともに、脳実質内に血腫の形成が認められ、試料溶液の注入を確認した(Fig. 1)。HbV群では、血腫近傍に色調の異なる領域が認められた。これは、小粒径のHbVが近傍組織に拡散した為と考えられた。しかし、RBCは殆ど血腫に留まった。

血腫近傍に浸潤した好中球数の変化をFig. 2に示す。組織損傷における生体の初期炎症反応の一つに、好中球の浸潤がある。注入1日後に最も多く見られたが、3日以降は低下した。群間に有意な差は見られなかった

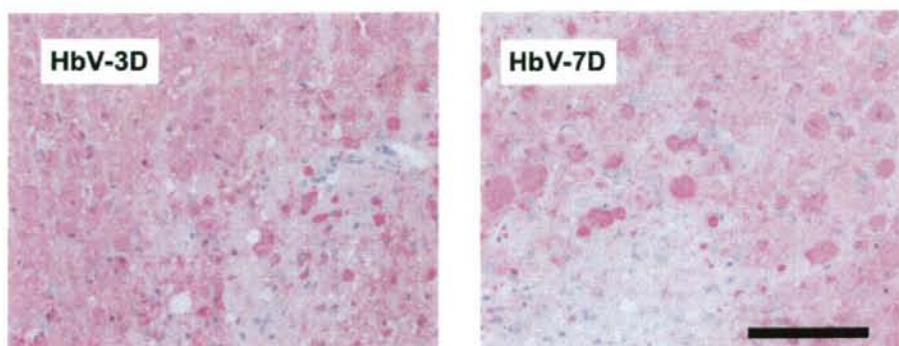
**Fig. 3**の抗ヒトHb抗体による免疫染色も、HbVが血腫近傍の組織内に拡散していることを支持する結果となった。3日後では染色された部位が丸い形として存在し、マクロファージが貪食したものと考えられた。7日後にも大量のHbVが血腫近傍に存在していることが明らかであった。

抗HO-1抗体による免疫染色では(**Fig. 4**)、注入後3、7日後に染色される部位が認められた。特に血腫の縁に多く認められた。HbV群では血腫近傍の組織まで薄くではあるがより広範に、染色部位が存在した。

Berlin blue染色では、注入3日後に両群で血腫近傍に大量のヘモジデリン沈着が認められた(**Fig. 5**)。しかし、HbVが拡散したと思われる組織内にはそのような強い染色は存在しなかった。

GFAP免疫抗体染色の結果、注入1日後には損傷部位近傍には染色される部位は無かった(**Fig. 6**)。しかし、3日後には両群ともに血腫近傍に肥大化したアストロサイトのネットワークが出現していた。7日後には更に、肥大化、過形成したアストロサイトが損傷部位に広範に存在していた。

#### D. 考察

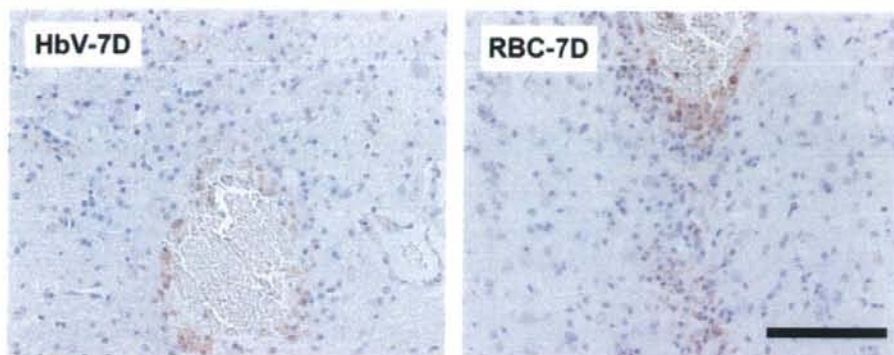


**Fig. 3.** Immunohistochemical staining with anti-human Hb antibody. (**Left**) Three days after injection of HbV. The macrophages phagocytosed the HbV. (**Right**) Even at 7 days, there still remained a large amount of HbV. Scale bar, 100  $\mu$ m.

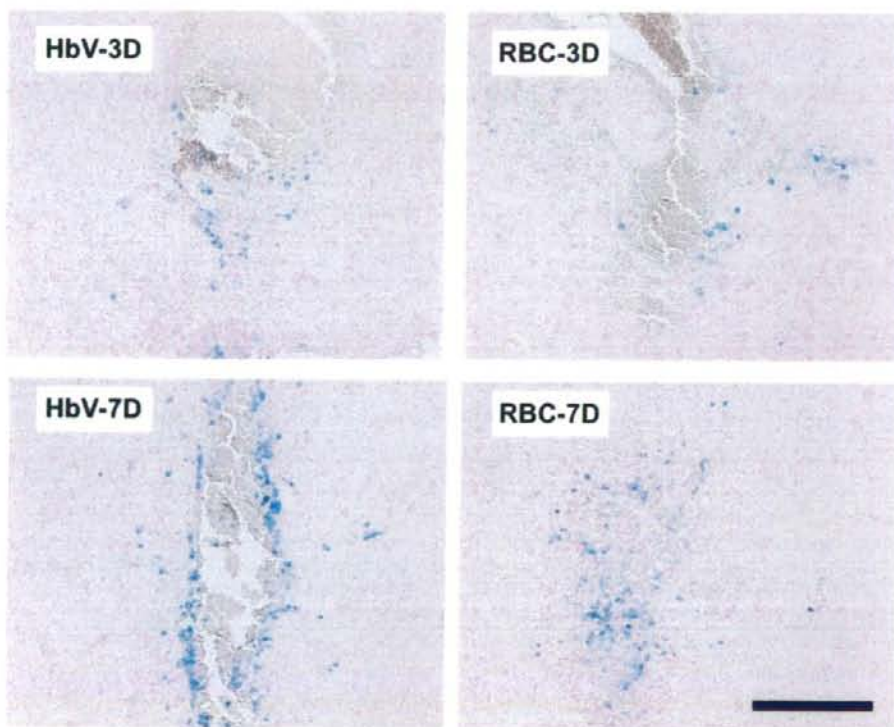
HbVが輸血代替として使用されることが期待される臨床応用の一つに、外傷性出血性ショックに対する蘇生液としての利用がある。しかし、従来の動物試験では健全な動物から脱血し、試料溶液を投与するもので、外傷を伴う検討は無かった。従って今回、頭部外傷など臓器に損傷を受けた時にHbVが与える影響を検討することは極めて重要である。本研究では予備的検討として、脳内出血モデルを用い、HbVあるいは比較として赤血球を脳実質内に直接注入し、その影響を検討した。

両群において、若干の行動学的異常が観察された。また、前足で棒に吊下がる時間を測定したところ、HbV群の方がRBC群に比較して注入1日後に長くなる傾向が認められた。脳内出血モデルラットが脳浮腫の生起によって前足の機能が低下することは報告例がある(Hua et al., 2002)。

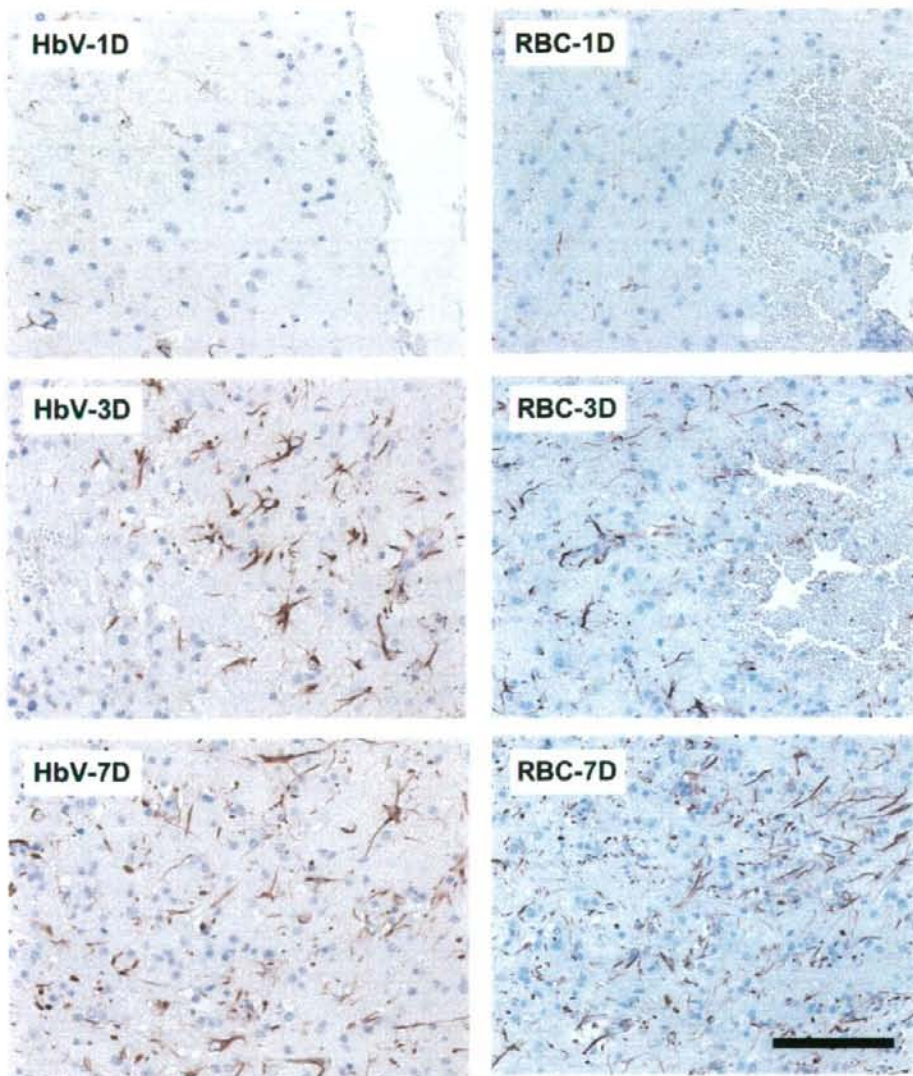
本実験では注入量を20  $\mu$ Lに設定した。Bhasinらの報告(2002)によれば、赤血球20  $\mu$ Lの注入では、脳浮腫とBBBの破綻が3日目までに生起する。また、30 $\mu$ Lでは死亡率が増大する(Wu et al., 2002)。本実験にあたりHbVが赤血球に比較して強い反応が出る可能性を懸念し、20  $\mu$ Lの注入量に設定したが、実際にはそのような顕著な反応は無かった。



**Fig. 4.** Immunohistochemical staining with anti rat HO-1 antibody of rat brain 7 days after injection of HbV (**Left**) and RBC (**Right**). The intense staining was confirmed especially at the rim of the perihematoma region. The tissue with dispersed HbV also showed the slight induction of HO-1 in the macrophages. Scale bar, 100  $\mu$ m.



**Fig. 5.** Berlin blue staining of rat brain 3 and 7 days after injection of HbV and RBC. Large amount of hemosiderin deposition was confirmed just nearly the hematoma site for both groups. Scale bar, 200  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Immunochemical staining with anti-GFAP-staining after injection of HbV and RBC. On day 1, the initial destruction of astrocytes in the perifocal zone for both groups, and from 3 days a dense network of hypertrophic processes reentered the perifocal zone. At 7 days, the hypertrophic and hyperplastic astrocytes distributed in a large area (c). Scale bar, 100  $\mu$ m.

組織病理学的検討の結果、HbV群およびRBC群ともに、注入1日後に血腫周辺に好中球が浸潤していた。これは、脳虚血や脳外傷の組織損傷に対する一般的な反応と考えられる(Strbian et al., 2006)。血腫周辺の好中球数は、1日目に両群ともに増大しているが、3日後には減少した。抗ヒトHb抗体免疫染色を実施したところ、小粒径のHbVの一部は、血腫近傍の組織に拡散している可能性が高い。他方、RBCは血腫内に留まっているように観察された。従って、HbVが周辺組織で代謝分解される過程について検討することは重要である

一般的に、血腫近傍組織には浮腫が生じ、血管内皮も損傷を受ける。Hbの分解生成物である鉄は、脂質の過酸化を促進し、BBBの破壊、脳浮腫形成を促進させる(Xi et al., 1998; Huang et al., 2002)。ヘモジデリンの沈着が血腫外周に集中していることから、これは主に溶血したRBCのHbに由来すると考えられた。他方、HbVが拡散したと考えられる血腫近傍組織には、RBC群で観察された強い沈着は無かったことから、HbVは赤血球よりも構造が安定で、マクロファージによる分解は緩やかであると考えられた。

マクロファージがHbVを貪食した状態は3日後以降から確認されることから、マクロファージが浸潤してくるまで遅れがあると考えられた。7日後でも、抗ヒトHb抗体染色でHbVの存在が明らかであり、HbVを静脈内投与した後の肝臓Kupffer細胞や脾臓マクロファージでの分解に比較して、遅い分解であると考えられた(Sakai et al., 2001; 2006)。この遅い分解反応は、Hb由来の毒性が急激に出ることを抑制する意味では、利点と言えるかもしれない。一般的に分子集合体であるリン脂質小胞体(liposome)は、赤血球と同様に脆弱なものと考えられがちであるが、実はHbVは極めて安定である。リン脂質(DPPC), cholesterol, PEG-lipidを含有し、凍結

融解をしてもHbの漏出は赤血球に比較して僅かである。また、DPPCは飽和型脂肪酸から構成され、不飽和型脂肪酸を多く有する細胞膜に比較し過酸化脂質を産生し難い(Yokohama et al., 1994; Szebeni et al., 1988)。

非細胞型の分子内架橋Hb溶液(DCLHb)について、脳内出血患者に投与する臨床試験が実施されたが、重篤な副作用が報告された。この物質はまた、重度の外傷性出血性ショック患者への投与も検討されたが、頭部外傷を負った患者で特に死亡率が高いことが報告された(Sloan et al., 1999)。機序は不明であるが、Hb分子(直径: 7 nm)は赤血球に比較して極めて小さいので、BBBが破綻した場合に脳組織により広範に拡散することが予想される。漏出したHbは実質細胞と直接的に接触し、中枢神経系に悪影響をもたらすと考えられる。この点、Hb小胞体は、脂質膜で覆われ代謝分解が遅いので、急激な毒性を抑えることに寄与する可能性はある。

本実験では、アストロサイトの形状変化が顕著であった。アストロサイトは、中枢神経系における主要な細胞種で、神経細胞に対し構造的、栄養的、代謝的支援を行い、シナプス活性を調節する重要な役割を担う。脳虚血や脳外傷におけるアストロサイトの機能損傷は脳神経系の生存を左右する(Chen & Swanson 2003)。脳外傷のとき、生き残ったアストロサイトが肥大化して増殖を始めることが知られている(Ridet et al., 1997)。この活性化アストロサイトは表面分子を提示し、様々な神経栄養性物質やサイトカインを放出し、軸索の再成長を促進させる(Feuerstein et al., 1998)。GFAP免疫染色の結果、HbVあるいはRBC注入後初期には、血腫近傍のアストロサイトは殆ど観察されず破壊された可能性も考えられたが、3日後には肥大化したアストロサイトが網目状に存在し、血腫近傍にまで広がっていた。7日後には肥大化、過形成したアストロサイトが広範に存在していた。こ

これらの変化は、HbV群、RBC群ともに同様に観察され、また、Koeppenらが報告した脳内出血後の反応とも同様であった。従って、本実験における脳内出血に対するアストロサイトの反応とその後の組織修復の過程は、外傷に対する正常の生理的反応であり、HbVが注入された場合でも同様に生起することが確認できた。

## E. 結論

脳内出血モデルとしてHbV分散液を脳実質内に直接注入したところ、HbVが血腫近傍組織に拡散していることが明らかになった。また、外傷に対する炎症反応として直後の好中球の出現、マクロファージの浸潤とHbVの貪食、損傷部位を修復する肥大化アストロサイトの出現が明らかになった。これらは組織損傷に対する正常な生理反応であり、赤血球の注入と比較して異常な反応は見られなかった。しかし今後更に、注入量を多くし、また長期的な観察によって安全性を確認する必要がある。現在、28日後までの観察を実施中である。

## (文献)

- Bhasin et al., Acta Neurochir Suppl. 2002;81: 249-51.  
Chen & Swanson. J Cerebral Blood Flow Metab. 2003; 23: 137-149.  
Feuerstein et al., Neuroimmunomodulation. 1998;5: 143-59.  
Hua et al., Stroke. 2002;33:2478-84.  
Huang et al., J Neurosurg. 2002;96:287-93.  
Koeppen et al. J Neurol Sci. 1995;134 Suppl:102-112.  
Ridet et al., Trends Neurosci. 1997;20:570-7.  
Sakai et al., Am J Pathol. 2001;159:1079-88.  
Sakai et al., Transfusion. 2006;46:339-47.  
Sloan et al., JAMA. 1999;282:1857-64.  
Strbian et al., J Cereb Blood Flow Metab. 2006;26:605-12.  
Szebeni et al., Biomater Artif Cells Artif Organs.

1988;16:301-12.

Wu et al., Brain Res. 2002;953:45-52.

Xi et al., Stroke. 2001;32:2932-8.

Yokohama et al., Artif Organs Today 1994;4:107-116.

## 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

### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)の生理食塩水分散液は膠質浸透圧が殆んどゼロである。HbVを出血性ショック蘇生液や血液希釈、体外循環の補充液に使用する際には、代用血漿剤との併用が必要になり、従来はひと血清アルブミン溶液(HSA)を多用して来た。しかし、臨床では様々な代用血漿剤が知られている。これらは水溶性高分子であるためHbVと相互作用し凝集体を形成する可能性があることが、*in vitro*試験(粘弾性計測)で明らかにされている。本研究では、術中出血を想定した動物実験を行い、出血に対してまず循環血液量を維持するために代用血漿剤を投与し、次いでHbV投与によりショックを回避する実験を実施し、代用血漿剤とHbVの併用が安全に実施できるかについて明らかにすることを目的とした。

### B. 方法

Wistar系ラット(♂、体重240-310 g)の循環血液量を56 mL/kg (Hct = 約42%、[Hb] = 14 g/dL)と仮定し、吸入麻酔下その10%脱血と代用血漿剤の同量投与を繰り返し、60%血液希釈を行った(この時点で[Hb] = 5.6 g/dL)。次いで、HbV (生理食塩水に分散、[Hb] = 10 g/dL)、或はsaline 20 mL/kg投与し(1 ml/min、この時点で[Hb] = 9.2 g/dL)、4時間観察した



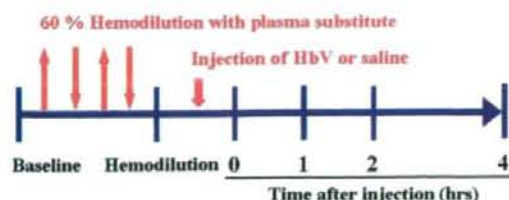


Fig. 1. Experimental procedure of hemodilution with a plasma expander and injection of HbV or saline.

Table 1. Physicochemical properties of plasma substitute solutions.

| Plasma expander    | Mw/<br>kDa | Concentration<br>/ g/dL | COP/<br>mmHg | DS/-      |
|--------------------|------------|-------------------------|--------------|-----------|
| HES <sub>670</sub> | 670        | 6                       | 27           | 0.75      |
| HES <sub>130</sub> | 130        | 6                       | 35           | 0.38~0.45 |
| HES <sub>70</sub>  | 70         | 6                       | 26           | 0.50~0.55 |
| MFG                | 30         | 4                       | 52           | -         |
| rHSA               | 67         | 5                       | 19           | -         |

HES: hydroxyethyl starch, MFG: modified fluid gelatin, rHSA: recombinant human serum albumin, COP: colloid osmotic pressure, DS: degree of substitution

(n = 6)(Fig. 1). 比較としてsalineで60%血液希釈を行った後、salineを投与する実験も実施した(n = 5)。測定項目は、血圧、心拍数、血液ガス組成(PaO<sub>2</sub>, PvO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, PvCO<sub>2</sub>, pH, Glu, B.E., HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Lac)、Hct値、粘弾性測定、マイクロレオロジー測定(MC-FAN)。測定点は血液希釈前、終了後、HbV投与直後、1、2、4時間後とした。代用血漿剤として(Table 1)、HES<sub>70</sub>(サリンヘス、杏林製薬製)、MFG(Gelofusine、B. Braun社製)、HES<sub>130</sub>(Voluven、

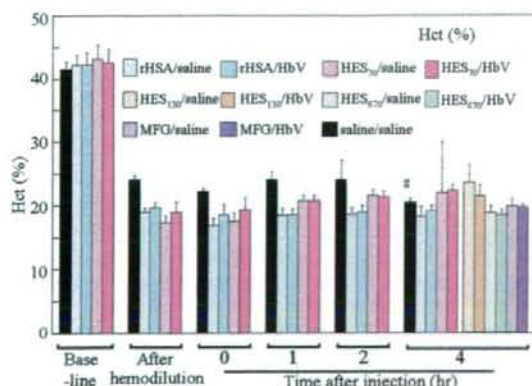


Fig. 2. Changes in Hct after hemodilution and injection of HbV or saline. Mean±SD. (#n = 2).

Fresenius社製)、rHSA (Bypha社製)、HES<sub>670</sub> (Hextend、Hospira社製)を使用した。ラットはデキストランに対してアナフィラキシー反応を示すことが知られているので本実験ではデキストランを使用しなかった。

## C. 結果および考察

### 1. Hct値の変化

代用血漿剤で血液希釈した場合は、HbV, salineを続いて投与した後、4時間経過しても全例が生存した。salineで血液希釈した後にsalineを投与した群は5匹中3匹が死亡した。先ずHct値の変化をFig. 2に示す。グラフにはrHSA、HES<sub>70</sub>及び比較としてsalineで血液希釈した群のみ経時変化を示し、それ以外は4時間後の値のみを示した。rHSA投与群及びHES<sub>670</sub>投与群では血液希釈後から4時間経過までほぼ一定した値を示した。しかし、それ以外のHES<sub>70</sub>、HES<sub>130</sub>を用いた実験系では血液希釈後から徐々に値が上昇する傾向を示した。Hct値の上昇は循環血液量の減少を示唆する。例えば5%のHct値の上昇は、約20%の循環血液量の低下を意味する。HESが血液中に長く留まり循環血液量を維持する性質は、その分子量とhydroxyethyl基の導入の割合を示す置換度(DS: degree of substitution)に依存する。HES<sub>70</sub>、HES<sub>130</sub>、HES<sub>670</sub>について各パラメーターを比較して

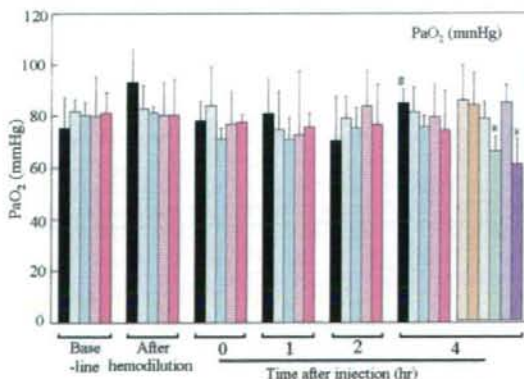
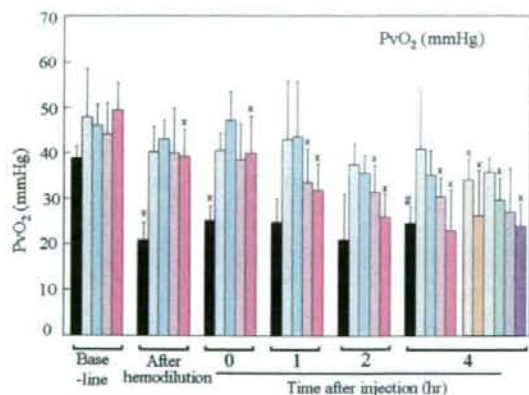


Fig. 3. Changes in PaO<sub>2</sub> after hemodilution and injection of HbV or saline. Mean±SD. (#n = 2). \*p<0.01 vs. baseline

みると(**Table 1**)、HES<sub>130</sub>のDS値は最も低い。このため、HES<sub>130</sub>は血中アミラーゼによって比較的分解されやすく分子量が大きいにも拘らずHES<sub>70</sub>と同じように短時間で血管外漏出しHct値が上昇したと考えられる。また、HES<sub>670</sub>は分子量、DS値ともに高く、低Hct値を維持する傾向を示した。また、対照として代用血漿剤を含まないsalineを用いた血液希釈では、salineが容易に血管外漏出し循環血液量を維持できない為にHct値が上昇した。

## 2. 酸素代謝

動脈血酸素分圧(PaO<sub>2</sub>, **Fig. 3**)及び動脈血CO<sub>2</sub>分圧(PaCO<sub>2</sub>)は、いずれの代用血漿剤を用いた場合においても安定に推移し、肺ガス交換機能は正常に保たれた。懸念されていたHbV凝集体による肺毛細管の栓塞などの影響は無いものと考えられた。静脈血酸素分圧(PvO<sub>2</sub>, **Fig. 4**)は、salineで血液希釈した場合は、極度の低下を示した。これは、循環血液量の低下により心拍出量が減少し、組織の酸素抽出量が増大した為である。他方、代用血漿剤で交換した場合は、初期のPvO<sub>2</sub>は高値を示し心拍出量の増大が示唆された。特にrHSAで交換した場合に最も高い値を維持したものの、他の代用血漿剤ではHbVの併用にもかかわらず時間とともに減少



**Fig. 4.** Changes in PvO<sub>2</sub> after hemodilution and injection of HbV or saline. Mean±SD. (#n = 2). \*p<0.01 vs. baseline

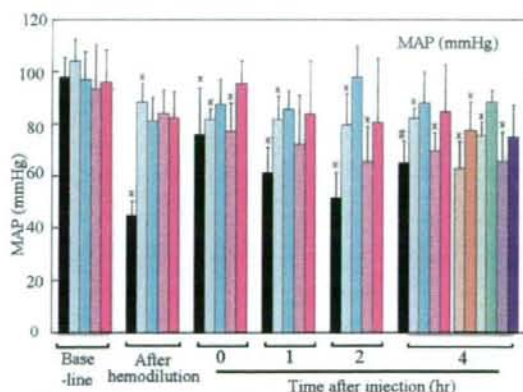
した。

## 3. 平均血圧の変化

平均血圧(MAP)は、全体的に緩やかに低下する傾向があったが、rHSAで血液希釈した場合に特に血圧が維持される傾向を示した(**Fig. 5**)。また有意差検定を行ったところsalineを投与した場合に全ての代用血漿剤を用いた系でBaselineに対して有意な低下があったのに対し、HbVを投与した系では殆ど有意な低下は認められなかった。血液希釈状態では血液粘度が低下する為に末梢血管の抵抗が減少し、これを心拍出量の増加だけでは補いきれない為に血圧は低下する。しかし、HbV投与により酸素運搬量が改善され血圧低下がより緩やかになったと考えられる。また、HbV投与による血圧値の異常上昇のような危険な兆候も見られず、凝集体の影響は確認されなかった。

## 4. その他のパラメーター

代用血漿剤を用いた実験系ではその他の測定値(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PaCO<sub>2</sub>, PvCO<sub>2</sub>, pH など)には大きな変化は見られず、呼吸機能は維持されていた。また、salineで血液希釈を行った対照群では乳酸値の著しい上昇や血圧の顕著な低下を示し、5匹中3匹が4時間以



**Fig. 5.** Changes in MAP after hemodilution and injection of HbV or saline. Mean±SD. (#n = 2). \*p<0.01 vs. baseline

内に死亡した。以上の結果から循環血液量減少によるショック状態からの回復に代用血漿剤の使用が有効であり、また代用血漿剤とHbVの併用が安全に行われることが示唆された。

## 5. 粘性測定

粘弾性装置MCR301を用いて4時間後の採血液(0.6 ml)の粘性を測定した。比較として血液希釈前の採血液も測定した。測定範囲は低剪断速度側より $0.01 \sim 1000 \text{ s}^{-1}$ とした。

正常ラットの全血と代用血漿剤によって血液希釈され、HbVもしくはsalineを投与されたラットの血液粘度を比較した(Fig. 6)。血液循環系での剪断速度は数十~数千 $\text{s}^{-1}$ であることが知られており、この流動状態では全血(control) > HbV投与群 > saline投与群の順に高い粘度を示したが、静止状態に近い低剪断速度ではsaline投与群 > 全血(control) > HbV投与群の順に高い粘度を示し、低剪断速度から高剪断速度へ移行する際に血液粘度の逆転が起こることが観察された。全血の高粘度と非ニュートン性を与える原因は最も多い赤血球が低剪断速度下で集合形成することが主因である。レオロジー分野では、大小2種類の粒子の混合系の粘度は大粒子の間にある小粒子がコロ(転)のような役割をして、粒子間の潤滑を高めるため単分散系の粘度より小さくなることが知られている。従って、HbV投与群血液の低剪断速度領域での顕著な粘度低下

は、HbVによって赤血球の集合体の形成が抑制された可能性が考えられる。

## D. 結論

今回の実験では、代用血漿剤とHbVを併用した際に血行動態、血液ガス組成ともに安定した値を示し、呼吸機能も維持されたことから、これらの併用が安全に行えることが示唆された。代用血漿剤によってはHct値の上昇、血圧の低下が見られる場合があるが、これは代用血漿剤の特性に起因し、HbVとは直接的関係は無いと考えられた。各パラメーターの安定性から、本実験モデルではrHSAの併用が最も適していると考えられた。

(謝辞) 本研究の推進にあたり、武岡 真司 教授(早大理工学術院)、宗 慶太郎 助教授(早大理工研)、佐藤 敦(早大理工学専攻 院生)、高折 益彦 先生(東宝塚さとう病院)の協力を得た。

## E. 健康危険情報

該当なし

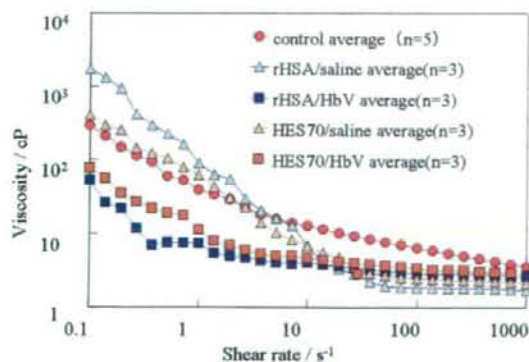


Fig. 6. Shear rate dependence of the viscosity of the rat blood samples collected before hemodilution and 4 hrs after injection of HbV or saline.  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 14. Hb 小胞体の腸管機能に対する影響に関する検討

腸管内腔を生理食塩水溶液で反口側方向に灌流し

##### A. 研究目的

出血性ショック時や敗血症などの場合、腸管が最も影響を受け易いことが知られている。また、血管障害に起因する虚血性腸炎において、効率の高い酸素供給が求められ、人工赤血球投与による酸素供給も一つの選択肢と考えられる。本研究では、Hb小胞体(HbV)の投与が腸管機能に与える影響と安全性に関する基礎知見を得るため、マウス摘出小腸を用い、HbV灌流中に見られる腸管蠕動運動と、腸管上皮透過性の恒常性を各種放射化標識化合物を用いて観察した。(本研究は、Prof. S. Collins, Dr. Presmyl Bercik, Dept. Gastroenterology, McMaster Univ., Canadaの共同研究として推進された。)(*c.f.* Bercik P, et al., Gastroenterology 1994; 106: 649-57)

##### B. 実験方法

雄性Swiss Websterマウスをketamin/xylazine腹腔内投与により麻酔状態とし、回腸末端の一部(3-5cm)を摘出、直ちに上腸間膜動脈の末端分岐にカニューレーションし、HbV溶液、或は生理食塩水での動脈内灌流を開始した。Organ chamberに移し、

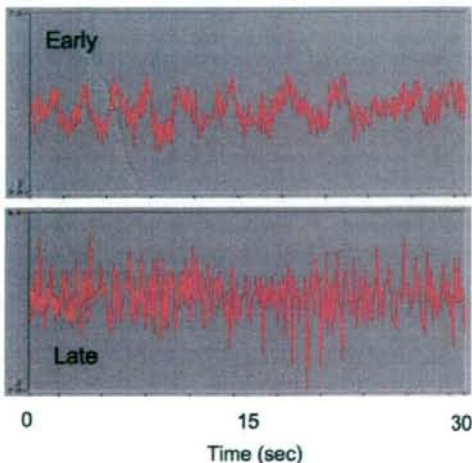


Fig. 1. Krebs's solution: Manometric recording at early and late phases.

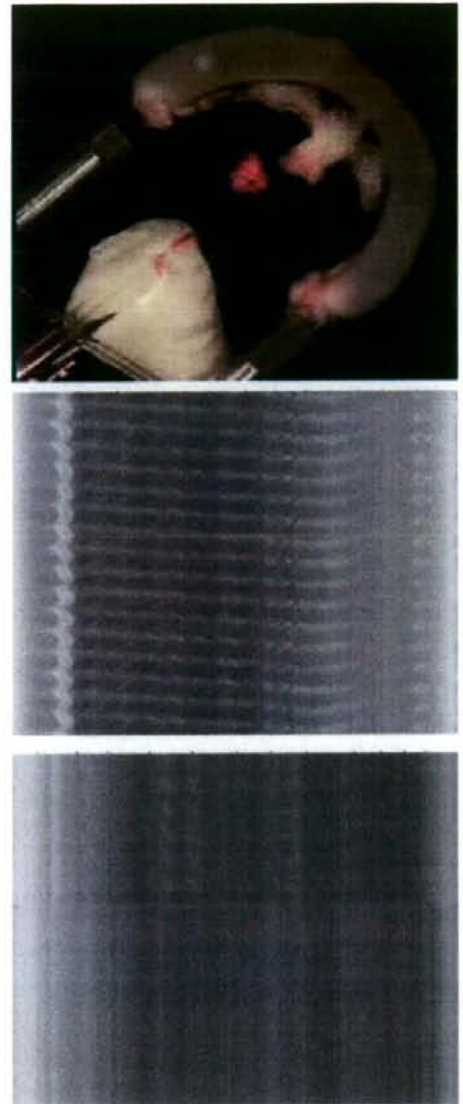


Fig 2. Intestinal perfusion with Krebs's solution (top), and the spatio-temporal image of the motion of intestine during perfusion with Krebs's solution at early (middle) and late (bottom) phases.

た。吻側および肛側の灌流圧を外部トランスデューサで計測し、同時に腸管ループをビデオ録画し、画像解析を行った。灌流終了後、ホルマリン固定し、H/E染色を行い、組織病理学的検討を行った。