

20080822A

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

人工赤血球のICU使用を目的とした最適化およびME技術の改良

(研究課題番号：H20-政策創薬-一般-005)

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 純三

(慶應義塾大学 医学部 麻酔科)

平成21(2009)年4月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

政策創業総合研究事業

人工赤血球のICU使用を目的とした最適化およびME技術の改良

(研究課題番号：H20-政策創業-一般-005)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 純三

(慶應義塾大学 医学部 麻酔科)

平成 21 (2009) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	1~5
武田 純三（慶應義塾大学医学部 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 武田 純三（慶應義塾大学医学部 教授）	6~12
2. 泉 陽太郎（慶應義塾大学医学部 助教）	13~17
3. 東 寛（北海道赤十字血液センター 研究部長）	18~24
4. 宗 慶太郎（早稲田大学 理総研 助教授）	25~28
4. 富田 裕（慶應義塾大学医学部 助教）	29~32
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33~36
IV. 研究成果の刊行物・別冊	37~

人工赤血球の ICU 使用を目的とした最適化および ME 技術の改良

主任研究者 武田 純三 慶應義塾大学医学部 麻酔科 教授

研究要旨

本研究では複数の専門科にまたがる原疾患に関らず様々な合併症を有する症例が集まる集中治療室 (Intensive Care Unit: ICU) において、人工赤血球、Hb 小胞体の臨床応用を想定した基礎的実験を行なった。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が厚生労働科学研究として多角的に行われている。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。本研究では ICU 管理と極めて密接な関係があり、人工赤血球投与の想定に際して必ず問題となると考えられる合併症や管理方法から幾つかの実験モデルを構築、確立し検討を行った。また ICU 管理においては不可避である様々な薬剤使用の影響についても検討した。今回は人工呼吸器管理、敗血症、人工赤血球の使用と他の薬剤、モニターとして ICU 管理に不可欠であるパルスオキシメータとの相互干渉、そして脳微小循環脳組織酸素分圧への影響について検討した。それぞれの検討では主として 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。

①ICU 管理を要する病態において人工呼吸器管理はほぼ必須であるといっても過言ではない。しかし、近年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 60% 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。

②炎症に関与するカスケードが増強した状態として Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) がある。ICU 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が SIRS である。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などは SIRS を惹起する代表的な病因の一つである。本研究では主にマウスを用い、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。また腸管を損傷し、限局性の腹膜炎惹起するモデルを用いて SIRS 状態を誘発、評価するモデルを検討した。このモデルではマウス腸間膜リンパ節の培養の陽性所見が得られ、実際に敗血症も誘発している可能性が示唆さ

れた。またもう一つのアプローチとして限局性腹膜炎惹起モデルにおける肺組織所見の評価を試みた。腸間膜リンパ節に比べ組織学的変化はより顕著であり、評価方法として有用である可能性が示唆された。今後これらの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。

③臨床で汎用される抗不整脈剤、抗てんかん剤、抗生物質、喘息治療剤、精神神経用剤のカテゴリーの中の薬剤 8 種と 10%-40% HbV とを混合し、薬剤濃度の減少の有無を測定することによって、ヘモグロビン小胞体と薬剤との間に吸着等の相互作用があるかどうか検討した。また HbV を含む血液検体中の薬剤の濃度を測定するうえで、干渉作用のある HbV を除去するため、簡便なデキストラン凝集と遠心法を用い、その利便性を調べた。用いた薬剤の中でハロペリドールはデキストラン添加によって既知濃度の 1/3 になり、干渉作用を受ける項目として注意を要することが示された。一方、他の 7 薬剤では測定値に影響はみられないことから、HbV を投与される臨床の場合において、簡便なデキストラン凝集と遠心法が多くの薬剤濃度測定に使用可能と考えられた。今回用いた 8 薬剤に HbV を添加した結果、HbV の濃度に依存していずれの薬剤においても濃度の減少がみられたことから、少なからず薬剤と Hb を内包するリポソームとの間に相互作用があることが示唆された。しかしながら、その減少は HbV 40%で 3 時間混和したプロプラノロールおよびハロペリドールでみられた約 30%が最も大きな変化であり、臨床問題にはならないことが明らかとなった。

④輸血代替物としての Hb 小胞体の使用が多いと想定される集中治療室(ICU)では、各種検査や医療機器により患者をモニターしながら治療が行われる。Hb 小胞体投与時でもこれらの検査やモニターが適切に行われる必要がある。特に、経皮的に動脈血酸素飽和度をモニターするパルスオキシメータは麻酔や呼吸管理の重要な指標となるため、Hb 小胞体による干渉作用を検討してきた。本研究では Hb 小胞体で 60%交換輸血したウサギにて、動脈血酸素飽和度に加え、MetHb、HbCO 含量も測定できる最新のパルスオキシメータ（マシモ社製）にて干渉作用の検討を行った。

⑤人工赤血球(Hb 小胞体)1) はヒト赤血球よりも 1/30 の小粒径で粘度も低く、既に出血性ショック時における蘇生液として検証され、赤血球と同等の酸素運搬機能を有することが示唆されている。血液型を問わず、室温で備蓄可能なことから、Hb 小胞体を緊急時に投与することにより出血性ショック状態の患者を蘇生させる可能性が期待される。しかし、出血性ショック時の Hb 小胞体投与による脳微小循環に与える影響はいまだ不明である。本研究では脱血量と同量の生理食塩水あるいは人工赤血球を全身投与し、脳表の変化、血圧および酸素分圧変化を検討した。全身血圧・脳表の酸素分圧値は、脱血後有意に減少し、再注入にて有意に回復した。一方、脱血後、人工赤血球の投与時には、脳表酸素分圧は回復後持続した。脱血後の生理食塩水の投与により、脳表酸素分圧は一過性に上昇したのみであった。人工赤血球投与は出血性ショック時などの際の微小脳循環障害を改善する可能性が示唆された。

分担研究者

泉 陽太郎 慶應義塾大学医学部 助教
東 寛 北海道赤十字血液センター 研究部長
宗 慶太郎 早稲田大学 理工研 准教授
富田 裕 慶應義塾大学医学部 助教

A. 研究目的

厚生労働科学研究として推進されている人工赤血球：ヘモグロビン（Hb）小胞体は、感染や血液型不適合の心配がなく、長期間保存が可能で、十分な安全性と機能が実証されつつある。我々が現在開発を展開している人工赤血球は長期保存が容易であり、いつでもどこでも血液型に関係なく、必要量を安全に供給できることを第一の目標としている。このような人工赤血球の開発は今後の医療に高い貢献度を示すと考えられる。この有力な候補の一つであるリン脂質小胞体(リポソーム)に精製したヒトヘモグロビンを内包した人工赤血球、Hb小胞体の開発を我々は現在展開している。現在物性規格上の処方が決定、製造技術・工程の確立とともに、臨床応用に向けて必要となる安全性評価指針および大量製造に関する検討が進行中である。本研究では集中治療室という臨床設定における使用を前提とした前臨床実験系の確立と評価を検討した。人工赤血球の実際の臨床応用を考えた場合には、手術室における術中の使用とともに集中治療室(Intensive Care Unit: ICU)における使用が多く想定される。ICUにおいては様々な合併症を併発した状態においての使用が必然的に多くなる。本研究ではICU管理において遭遇する頻度の高い合併症の中から、人工呼吸器管理、出血性ショックおよび敗血症、人工赤血球と他の薬剤との相互作用の可能性、人工赤血球投与の脳微小循環への影響を想定し、それぞれ動物モデルの開発と検討を行った。更にICUでは様々な機器使用下における人工赤血球投与が想定される。特に動脈血中の酸素飽和度測定は重要である。現在パルスオキシメータを使い簡単に、継続的にモニタリングが可能であるが、人工赤血球が血液に混在している場合の測定に関しては十分な知見が得られていないため検討した。

B. 研究方法

A 人工呼吸器管理は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）。本研究ではウサギのVILIモデルに人

工赤血球Hb小胞体（HbV）を投与し、肺障害の程度に影響を与えるか否かを検討した。ICU管理症例においては循環血液量維持のため膠質を投与する可能性が高く、また交換率を増大させ循環動態を保つためには膠質添加が不可欠であるため、膠質液として5%アルブミン溶液を分散液として検討した。実験には雄、日本白色家兎（2.0～2.5 kg）を用いた。全身麻酔下に気管切開を行い、高一回換気量（30 ml/kg）での人工換気を約4時間行った。この換気量においてVILIが誘導されることの確認を先ず行った。続いて循環血液量の交換を約60%として実験を行った。試料としては5%アルブミン溶液に分散したHbVと各分散液を比較検討した。

B ICU管理症例において併発している合併症を包括的に把握する観点から提唱された概念の一つとしてSystemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)のモデル作成について検討した。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、対処方法もある程度共通していると考えられている。本研究では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ショックがあり、出血性ショックあるいは敗血症性のショックはまたSIRS状態を惹起する代表的な原因であることに主眼を置いている。出血性ショックからSIRS状態への移行する際に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がラットにおいては再現が困難であった。本研究ではラットおよびマウスを用い、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。また少しアプローチを変更し、腸管に創を作成し限局性の腹膜炎を作成するモデルを検討し、その際に腸間膜リンパ節とともに肺の所見の評価を試みた。

C ICUでは様々な薬剤が使用される。このためHbVとICUで使用される薬剤や患者が服薬している薬剤と相互作用し、吸着やHbV内に入り込むことによって血中治療有効濃度が低下してしまう可能

性の有無を検討しておく必要がある。本試験においては、血中有効治療濃度の最低値を終濃度として用いた。反応液の全量は $900 \cdot l$ とした。血漿量はいずれも $450 \cdot l$ とし、HbV を終濃度 0%, 10, 20, または 40% 添加し、全量が $360 \cdot l$ となるように生理食塩液にて調整した。上記に示した終濃度となるように生理食塩液にて希釈した薬剤液 $90 \cdot l$ を添加した。混合直後、およびローテーターにて $37^{\circ}C$ にて 3 時間インキュベーション後、デキストラン (分子量 $400 \sim 500$ kDa, SIGMA) 溶液 ($450 \cdot l$) を終濃度 2.6 g/dl で添加混合した。10 分間室温静置後 15000 rpm, 10 分遠心分離し反応上清を得た。なお、デキストランのかわりに等量の血漿を混合添加したものを対照においた。

HbV 溶液中で HbV パーティクルは 39.5 容積% を占める (HbV-crit, 39.5 vol%) ので、添加した薬剤は HbV が添加されている血漿の中での希釈は少なくなる。そのため、最終的な薬剤の濃度は HbV-crit を考慮に入れた酒井らの報告に準じて補正した。即ち、 10% HbV の溶液の場合は、 $90 \cdot l$ の HbV を添加しているので、 $90 \times (1 - 0.395) = 54 \cdot l$ となる。そのため、 $0.961 (= (450 + 90 + 270 + 54) / (450 + 360 + 90))$ の係数を測定濃度に乗じた。同様に、 20% HbV, 40% HbV の場合は、それぞれ 0.921 , 0.842 の係数を乗じた。

HbV の各薬剤への影響は、repeated measures ANOVA とボンフェローニ検定で解析した。

D 人工呼吸器が惹起する肺障害 (ventilator induced lung injury: VILI) モデルにおいて Hb 小胞体での 60% 交換輸血試験を実施し、パルスオキシメータでの計測を実施した (使用機器: Radical-7, Masimo 社製)。動物には日本白色家兎 (雄、 $2.0 \sim 2.5$ kg) を使用した。

麻酔下、人工換気装置を装着した兎の足部を脱毛し、パルスオキシメータの粘着式センサー (Rainbow®R20) を取り付けた後動脈血酸素飽和度 (SpO₂)、MetHb 含量、COHb 含量が一定値で推移することを確認した。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 10 ml/min)、循環血液量の約 60% を Hb 小胞体で置換した。Hb

小胞体による交換後から、SpO₂、MetHb 含量、COHb 含量を 4 時間までモニターした。また、交換直後、30 分、120 分、180 分、240 分後に採血し、遠心分離で血球成分を沈殿させ、血漿中に浮遊する Hb 小胞体を回収した。Hb 小胞体由来の Hb をシアノメト Hb 法で定量した。また、血漿中に浮遊する Hb 小胞体由来の Hb のメト化率をデオキシ Hb/MetHb 二成分系のスペクトル解析により算出した。

E C57BL/6J マウスの頭部を麻酔下、定位固定装置に固定し、左頭頂側頭葉上に頭窓を作成、硬膜は留置し、脳表に酸素電極を固定した。右大腿動脈・尾静脈にカテーテルを挿入し、 $0.3 \sim 0.5$ ml の全血を脱血・再注入する間の脳表関心領域 (ROI) の約 $50 \mu m$ の深さにおける脳実質内単一の毛細血管内の個々の FITC ラベル赤血球の動きをビデオカメラ (30 frames/s) あるいは高速度カメラ共焦点レーザー顕微鏡 (500 frames/s) を用いて観察、連続記録した。同時に全身血圧、および脳表酸素分圧変化を観察・連続記録した。その後、脱血量と同量の生理食塩水あるいは人工赤血球を全身投与し、脳表の変化、血圧および酸素分圧変化を検討した。

C. 研究結果・考察

A 血液ガスデータおよび体血圧は実験中ほぼ安定していた。動脈血酸素分圧は人工呼吸開始後時間経過とともに全群で低下した。生理食塩水群では循環動態が維持できず実験の完遂は不可能であった。 5% アルブミン溶液群では時間経過とともに低下がみられた。これに対して 5% アルブミン溶液分散 HbV 群ではほぼ一定に保たれた。切除肺においては両群で肺水腫が見られたが HbV 投与群では軽減されている可能性があった。さらなる組織学的検討を要する。さらなる検討が必要であるが、 5% アルブミン溶液分散においては Hb 小胞体の投与が VILI を軽減する可能性が示唆された。換気量をさらに増加させた検討も必要と考えられた。

B 無処置のラットにおいては上腸管膜動静脈周

囲の脂肪組織中に肉眼的に微小なリンパ節が少数確認できたのみであった。病理組織学的にはこれらがリンパ節であることが確認できたが、培養による陽性所見は得られなかった。腸管損傷モデルとしては盲腸の回盲部より末梢を結紮後同部を18G針で穿刺し、閉腹した。1~2日目に開腹を行った。腹腔内には高度な限局性の腹膜炎が見られた。生存できないマウスもあった。腸管膜脂肪組織中のリンパ節には腫大が見られた。病理組織学的にはリンパ節が確認された。培養結果は好気性培養が陽性であった。嫌気性培養は陰性であった。血液培養も少数ではあったが培養陽性所見が得られた。また肺では顕著な炎症所見がみられ、いくつか特異的なサイトカイン変化の可能性も示唆された。本モデルにより SIRS 状態における人工赤血球投与の影響に関する予備的知見が得られる可能性が示唆された。

C 用いた薬剤の中でハロペリドールはデキストラン添加によって既知濃度の 1/3 になり、干渉作用を受ける項目として注意を要することが示された。一方、他の 7 薬剤では測定値に影響はみられないことから、HbV を投与される臨床場において、簡便なデキストラン凝集と遠心法が多くの薬剤濃度測定に使用可能と考えられた。今回用いた 8 薬剤に HbV を添加した結果、HbV の濃度に依存していずれの薬剤においても濃度の減少がみられたことから、少なからず薬剤と Hb を内包するリボソームとの間に相互作用があることが示唆された。しかしながら、その減少は HbV 40% で 3 時間混和したプロプラノロールおよびハロペリドールでみられた約 30% が最も大きな変化であり、臨床上一問題にはならないことが明らかとなった。

D 多波長パルス分光法によりパルスオキシメータで経皮的・非侵襲的にモニターできる項目が増大し、救命救急や集中治療においてパルスオキシメータの重要性が増大していくものと思われる。測定項目により Hb 小胞体の干渉作用は異なるため、各項目について干渉作用の有無を把握しておく必要がある。今回の検討したパルスオキシメータでは、Hb 小胞体投与後でも SpO₂ および MetHb 含量のモニターへの干渉は比較的少ないが、Hb 小胞体の干渉作用により HbCO のモニターは実質的に困難と考えられる。

E 脱血後、血管内の赤血球速度の遅延、停滞所見が得られ、再注入によって有意に回復した。全身血圧・脳表の酸素分圧値は、脱血後有意に減少し、再注入にて有意に回復した。一方、脱血後、人工赤血球の投与時には、脳表酸素分圧は回復後持続した。脱血後の生理食塩水の投与により、脳表酸素分圧は一過性に上昇したのみであった。人工赤血球投与は出血性ショック時などの際の微小脳循環障害を改善する可能性が示唆された。

D. 結論

ICU という特殊な環境における人工赤血球使用に関する複数の重要な知見が得られた。本研究では ICU において想定される病態および疾患管理方法として人工呼吸器管理下における肺への影響、敗血症、種々の薬剤およびモニター装置との相互作用、さらに脳微小循環への影響を検討した。さらなる検討が必要であるが、いずれの使用状況においても人工赤血球、Hb 小胞体の有用性が示唆された。また ICU 管理における病態に対応する小胞体の適正使用についても可能性が示唆された。次年度のさらなる研究の進展が期待される

分担研究報告書

人工赤血球の ICU 使用を目的とした最適化および ME 技術の改良

分担課題： ICU における呼吸障害の分析と人工赤血球利用法の開発

主任研究者	武田 純三	慶應義塾大学医学部	麻酔科	教授
研究協力者	長田 大雅	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
	森崎 浩	慶應義塾大学医学部	麻酔科	准教授

研究要旨

現疾患は多岐にわたるものの、集中治療室 (ICU) 管理においては程度の差はあるものの何らかの肺障害の発生を前提に治療が必要となる症例が多く、またすでに人工呼吸器管理が行われている場合も多い。本研究では、人工赤血球の投与が人工呼吸器管理下にある肺に及ぼす影響について検討した。人工呼吸器管理は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)。本研究では極端な状況を想定しウサギの VILI モデルに人工赤血球 Hb 小胞体 (HbV) を 5% アルブミン分散液として投与し、主として肺障害の程度に悪影響を及ぼすか否かを検討した。60% 交換率では HbV 群における VILI の度合いは 5% アルブミン投与と比較して軽度である可能性が示唆された。

A. 研究目的

急性の管理を要する重篤な状態に対する対応は多くの場合集中治療室(Intensive Care Unit: ICU)において文字通り集中的に行われる。この際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陽圧および過進展を受ける。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部

分が多いが、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自体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おり全身管理における重要性を意味している。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機能への影響を検討するための基礎的な知見を得るためのモデル作成を目標とした。この可能性のあるモデルの一つとしてウサギを用いた VILI モデルを考えた。状況と

して極端なモデルとなるが、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血管内容積を保つためにも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。このため本研究では 5%アルブミン液に分散させたヘモグロビン小胞体試料を中心に検討した。投与量（交換率）は従来の検討より高い 60%交換を中心に検討した。

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 22G 針にて耳静脈を確保した。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、ほぼ通常の換気圧（本実験では低一回換気圧と定義する、12cmH₂O）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

気圧 (30 cmH₂O)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。高一回換気圧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)ニプロにて調製、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

予備実験として行った生理食塩水群では 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 36±3% から交換後 17±6%、alb 群では交換前 37±3% から交換後 14±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。Alb 群で若干ヘマトクリットが低下したが、循環動態が少し不安定であった点と関連があったかもしれない。いずれの群でも膠質である 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。

平均体血圧は全体的に低めに推移したが時間とともに序々にやや低下する傾向はあったものの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安定であった。

動脈血酸素分圧は時間経過とともに両群で若干低下傾向が見られた。(preex:脱血交換前、postex:脱血交換後)。alb 群では時間経過とともに有意な低下がみられたが、HbValb 群では有意な低下は見られず、alb 群に比べて有意に高く推移した(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た(図4)。

PaO2(mmHg)

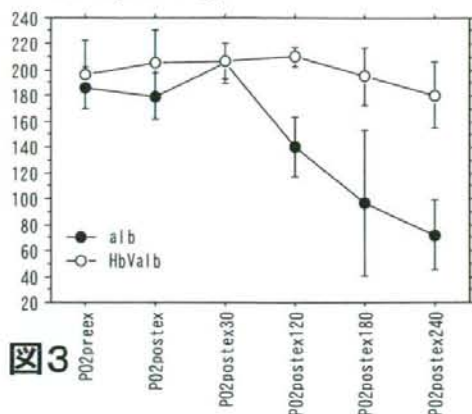


図3

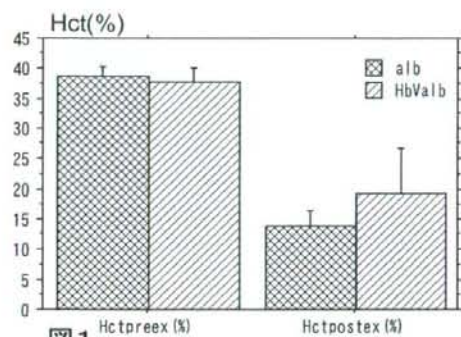


図1

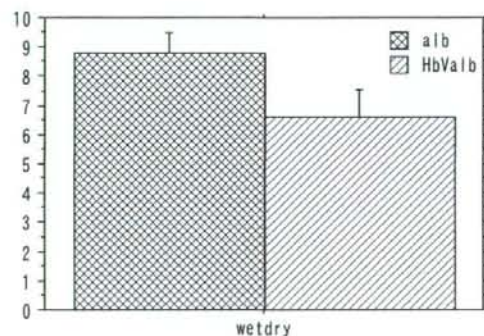


図4 湿乾重量比

BP(mmHg)

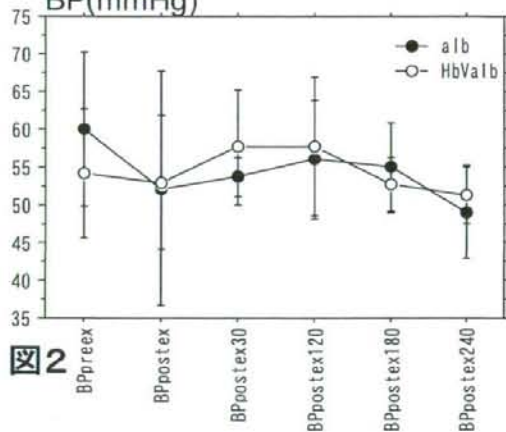
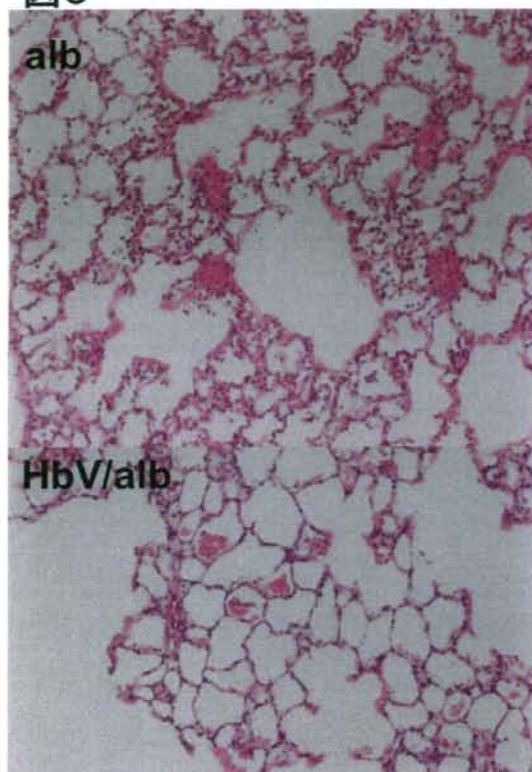


図2

図5



以前の実験では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がある。採取した肺のHE染色においては両群で肺水腫が見られたがその程度はalb群でより高い傾向が見られた(図5)。肺胞隔壁の肥厚およびうっ血所見もalb群で高度な傾向と思われた。好中球浸潤などの炎症所見も同様の傾向であった。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60%に設定した。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。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。この機序についてさらなる検討を要する。

D. 結論

人工呼吸器管理と併用しながら人工赤血球を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、少なくとも悪影響は明らかではなかった。また分散液として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。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. Yoshi Misonoo, Kiyoshi Moriyama, Tatsuya Yamada, Itsuo Nakatsuka, Junzo Takeda. Nasotracheal Intubation with a 32F Blue Line Endobroncheal Tube®. *Anesth Analg* 106(6): 1927, 2008.
 2. Fujishima S, Morisaki H, Ishizaka A, Kotake Y, Miyaki M, Yoh K, Sekine K, Sasaki J, Tasaka S, Hasegawa N, Kawai Y, Takeda J, Aikawa N. Neutrophil elastase and systemic inflammatory response syndrome in the initiation and development of acute lung injury among critically ill patients. *Biomed Pharmacother*. 2008 Jun;62(5):333-8.
 3. 武田純三. 日帰り麻酔と筋弛緩薬. 麻酔. 57 : 845-852, 2008.
 4. 武田純三. 麻酔とコリンエステラーゼ阻害薬. 臨床麻酔. 32(7) : 1149-1156, 2008.
 5. Kuribayashi, Junya, Sakuraba, Shigeki, Kashiwagi, Masanori, Hatori, Eiki, Tsujita, Miki, Hosokawa, Yuki, Takeda, Junzo, Kuwana, Shun-ichi. Neural Mechanisms of Sevoflurane-induced Respiratory Depression in Newborn Rats. *Anesthesiology*. 109(2):233-242, 2008.
 6. 麻酔実践テキスト。武田純三、森田茂徳 編、南江堂、2008、東京。第1章 麻酔と安全。
 7. Yamamoto S, Yamada T, Kotake Y, Takeda J. Cardioprotective effects of nicorandil in patients undergoing on-pump coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2008 22(4):548-53.
 8. 矢島 聡、森崎 浩、武田純三. 特集 重症患者における血糖管理「高血糖と腸管壁防御機構」. *ICUとCCU*. 32(10):815-820, 2008
 9. 合併症患者の麻酔 スタンダード. 監修：武田純三、編集：高野学美、忍田純哉. 克誠堂出版、東京、2008/11/17
 10. 麻酔看護のポイント 360. 武田純三 編、メディカ出版、大阪、2009.
 11. 木下智恵、小杉 志都子、橋口さおり、津崎晃一、武田純三. 合成 Xa 阻害薬投与に伴う股関節全置換術の術後鎮痛法 -硬膜外鎮痛とIVPCAの比較-臨床麻酔. 33(1):23-29, 2009
 12. 中塚逸央、武田純三. 睡眠時無呼吸症候群患者の麻酔管理. 臨床麻酔. 33(1):55-60,2009.
 13. Hiroshi Morisaki, Satoshi Yajima, Yoko Watanabe, Takeshi Suzuki, Michiko Yamamoto, Nobuyuki Katori, Saori Hashiguchi, Junzo Takeda. Hypercapnic acidosis minimizes endotoxin-induced gut mucosal injury in rabbits. *Intensive Care Med* (2009) 35:129-135
 14. 武田純三. 日帰り手術の麻酔. 麻酔科学レビュー 2009. 天羽敬祐監修、総合医学社、東京、2009、153-157
 15. Yoshifumi Kotake, Michiko Yamamoto, Midori Matsumoto, Takashige Yamada, Hiromasa Nagata, Hiroshi Morisaki and Junzo Takeda. Difference in autologous blood transfusion-induced inflammatory responses between acute normovolemic hemodilution and preoperative donation. *J Anesth* (2009) 23:61-66
 16. Ryohei Serita, Hiroshi Morisaki and Junzo Takeda. An individualized recruitment maneuver for mechanically ventilated patients after cardiac surgery. *J Anesth* (2009) 23:87-92
 17. Yoshifumi Kotake, Midori Matsumoto, Tomoko Yorozu and Junzo Takeda. Recurrent ST-segment elevation on ECG and ventricular tachycardia during neurosurgical anesthesia. *J Anesth* (2009) 23:115-118.
- ## 2. 学会発表
1. H. Seki, M.D., K. Moriyama, M.D., Ph, Y. Shiraiishi, Ph.D., K. Fukunaga, M.D., Ph, S. Tasaka, M.D., Ph, A. Ishizaka, M.D., Ph, J. Takeda, M.D., PhD / Pyrimidylpiperazine Attenuated Neutrophil Recruitment on Acid-Induced Lung Injury in Mice / SCA 29th Annual Meeting & Workshops / August, 2008 / Toronto
 2. Y. Hosokawa¹, H. Morisaki¹, I. Nakatsuka¹, T. Satoh², Y. Yoshimura², J. Takeda / Intravenous Fentanyl Patient-Controlled Analgesia for Labor Pain/ SOAP 40th Annual Meeting / Apr, 2008 / Chicago
 3. Kae Miyamoto, Katsuo Terui, Kazumi Y. Tamura, Kaori Tarui, Hideki Miyao, Saki Hosokawa*, Hiroshi Morisaki*, Junzo Takeda/ Should Left Uterine Displacement Be Routinely

- Maintained Until Delivery in Spinal Anesthesia for Cesarean Section? / SOAP 40th Annual Meeting / Apr, 2008 / Chicago
4. Hiroshi Morisaki, Ryohei Serita, Kiminori Sugino, Koichi Ito, Junzo Takeda / Excessive Fentanyl during Thyroid Surgery Not Only Increases the Risk of Pnv but Postoperative Pain / 2008 ASA Annual Meeting / Oct, 2008 / Orland
 5. Hiromasa Nagata, Takashige Yamada, Yoshifumi Kotake, Junzo Takeda / Continuous Infusion of Lidocaine Attenuates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits / 2008 ASA Annual Meeting / Oct, 2008 / Orland
 6. Yoshifumi Kotake, Michiko Yamamoto, Takashige Yamada, Hiromasa Nagata, Junzo Takeda / Cardiac Output and Splanchnic Perfusion during Infrarenal Aortic Cross-Clamping in Humans / 2008 ASA Annual Meeting / Oct, 2008 / Orland
 7. Nobuyuki Katori, Tatsuya Yamada, Junzo Takeda / Pharmacokinetics of Recombinant Activated Factor VII (Rfvii) in Patients with Factor VII Deficiency / 2008 ASA Annual Meeting / Oct, 2008 / Orland
 8. Takashige Yamada, Hiromasa Nagata, Takeshi Suzuki, Yoshifumi Kotake, Junzo Takeda / ANP Reduces Ischemia-Reperfusion Induced Hepatic Microcirculatory Failure and ADAMTS13 Inactivation / 2008 ASA Annual Meeting / Oct, 2008 / Orland
 9. Akiko Ishikawa, Atsuo Mori, Nobuyuki Kabei, Hiroshi Morisaki, Junzo Takeda / Epidural Cooling Minimizes Spinal Cord Injury after Aortic Clamping by Depressing Reactive Hyperemia / 2008 ASA Annual Meeting / Oct, 2008 / Orland
 10. Junya Kuribayashi, Shun-ichi Kuwana, Yuki Hosokawa, Eiki Hatori, Junzo Takeda / Effect of a New Sedative, JM-1232(-) on Central Respiratory Activity in Neonatal Rats / 2008 ASA Annual Meeting / Oct, 2008 / Orland
 11. 長田大雅、山田高成、矢島 聡、鈴木武志、芹田良平、森崎 浩、武田純三 / 帝王切開後に非閉塞性腸管虚血症 (NOMI)が疑われた1例 / 第17回集中治療医学会関東甲信越地方会 / 2008年8月 / 東京
 12. 矢島聡、鈴木武志、森崎 浩、武田純三 / 小児急性白血病患者の重症急性膵炎に対し、持続的血液濾過透析が有効であった一症例 / 第17回集中治療医学会関東甲信越地方会 / 2008年8月 / 東京
 13. 山田高成、長田大雅、櫻井裕教、矢島 聡、羽鳥英樹、鈴木武志、印南靖志、芹田良平、森崎 浩、武田純三 / 人工呼吸管理に際し非脱分極性筋弛緩薬を長期投与した一例 / 第17回集中治療医学会関東甲信越地方会 / 2008年8月 / 東京
 14. 若泉謙太、中塚逸央、森山 潔、武田純三 / 重度の睡眠時無呼吸症候群(Sleep apnea syndrome:SAS)を合併した病的肥満患者の麻酔経験 / 日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第48回合同学術集会 / 2008年9月 / 東京
 15. 植松明美、加藤純悟、森山 潔、武田純三 / 全身麻酔中に塩酸モルヒネが原因と思われる喘息発作を発症した一症例 / 日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第48回合同学術集会 / 2008年9月 / 東京
 16. 大谷由貴 細川幸希 長田大雅 森山潔 武田純三 / 巨大胎盤腫瘍合併妊娠に対する帝王切開手術の麻酔経験 / 日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第48回合同学術集会 / 2008年9月 / 東京
 17. 桐野清夏、小林佳乃、朝木千恵、生井春美、小澤治子、伊澤仁志、重松俊之、武田純三 / Arrow社製硬膜外カテーテルの位置異常を術後CTで確認した一例 / 日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第48回合同学術集会 / 2008年9月 / 東京
 18. 須加原史子、安藤嘉門、石川明子、森山潔、武田純三 / 肝臓原発異所性褐色細胞腫の胸椎転移に対する緊急後方除圧術の麻酔経験 / 日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第48回合同学術集会 / 2008年9月 / 東京
 19. 神藤篤史、逢坂佳宗、中塚逸央、橋口さおり、武田純三 / 腹式単純子宮全摘術及び両側付属器切除術を行った気管狭窄症の一例 / 日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部 第48回合同学術集会 / 2008年9月 / 東京
 20. 増田祐也、森山潔、橋口さおり、武田純三 / 先天性ミオパチーに合併した症候性側弯症の麻酔

- 管理/日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部
第48回合同学術集会/2008年9月/東京
21. 増田祐也、森山潔、橋口さおり、武田純三/先天性ミオパチーに合併した症候性側弯症の麻酔管理/日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部
第48回合同学術集会/2008年9月/東京
22. 永淵万理、矢島聡、森山潔、武田純三/先天性表皮水疱症患者の麻酔経験/日本麻酔科学会
東京・関東甲信越支部 第48回合同学術集会/
2008年9月/東京
23. 關根 一人、逢坂 佳宗、森山 潔、武田 純三/腹部大動脈Yグラフト置換術中に下肢動脈血栓が生じ、NIRS(Near Infrared Spectroscopy)を用いて血流評価を行なった一例/日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部
第48回合同学術集会/2008年9月/東京
24. 長塚行雄、加藤純悟、豊永晋也、森山潔、山田高成、香取信之、武田純三/硬膜外穿刺中に血圧低下をきたした胞巣状軟部肉腫心内転移の一例/日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部
第48回合同学術集会/2008年9月/東京
25. 寿原 朋宏、森山 潔、細川 幸希、森崎 浩、武田 純三/一側性反回神経麻痺に対する音声改善手術におけるデクスメトミジンの術中使用経験/日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部
第48回合同学術集会/2008年9月/東京
26. 増田裕也、森山 潔、橋口さおり、武田純三/食道癌術後患者の収縮性心膜炎に対する心膜剥離術の麻酔経験/日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部
第48回合同学術集会/2008年9月/東京
27. 鈴木康生、牧戸香詠子、加藤純悟、香取信之、武田純三/術中の経食道心エコーにより心房中隔欠損症を診断した一例/日本麻酔科学会 東京・関東甲信越支部
第48回合同学術集会/
2008年9月/東京

分担研究報告書

人工赤血球の ICU 使用を目的とした最適化および ME 技術の改良

分担課題： SIRS 状態に於ける人工赤血球の機能解析

分担研究者 泉 陽太郎 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助教

研究要旨

(Systemic Inflammatory Response Syndrome : SIRS) とは様々な原因により全身性に炎症反応が亢進した状態である。原因によらずある程度共通した治療法が必要である。集中治療室 (ICU) 管理を要する症例の多くにおいて見られる。人工赤血球は赤血球輸血の代替として開発が進められているが、人工赤血球投与の必要性が予測される出血性ショックにおいては、ほぼ全例に SIRS 状態が見られる、あるいは潜在している可能性が考えられる。このような状態において人工赤血球の投与を行った場合には正常な状態とは異なる影響が見られる可能性がある。本研究では SIRS 状態を再現し評価する動物モデル作成を試みた。出血性ショックにおいて腸間膜リンパ節への腸内細菌の移行が報告されており、SIRS 状態の指標の一つになり得ると考えられる。以前我々は人工赤血球を用いた出血性ショック蘇生において条件を変化させて腸管膜リンパ節の培養を行った。また、いくつかの条件において血中の複数のサイトカインを測定した。しかしそれらの条件設定では腸管膜リンパ節培養で細菌は検出されず、培養方法の再検討および出血性ショック状態をさらに遷延させる必要があると考えられた。また血中のサイトカインについては因子により増加時期が異なるため、異なった検出時期が必要と考えられた。これらの結果を踏まえて、本研究では SIRS 状態を再現するモデルとして腸管損傷モデルを検討した。マウスを用いた盲腸穿孔あるいは盲腸結紮後穿孔モデルでは限局性の腹膜炎が発生し、腸間膜リンパ節腫大が高率に見られた。またリンパ節培養にて大腸菌、腸球菌、B 溶連菌が検出された。しかし再現性と評価の定量性に問題が見られた。一方肺組織は全身状態を反映する可能性があり、実際に肺ではより顕著な変化が見られた。今後人工赤血球投与による SIRS 状態の変化を検討する有用なモデルになり得ると考えられた。

A. 研究目的

ICU とは病院の 1 施設としての概念である。呼吸、循環、代謝などについて短時間に急性の管理を要する患者が集められ、まさに集中的管理が行われる。従って、管理を要する症例の原疾患は多岐にわたる。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。SIRS を定義する意義としては、SIRS にはその原因に関らず共通の臨床所見と病態があり、加えて対処方法も共通している部分が多いことが挙げられる。一方、ICU あるいは ICU

環境において人工赤血球を使用する対象の一つ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 状態への重要な移行原因の一つとして腸管の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複数のサイトカインの推移を確認することを目指した。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、アプローチを変更し腸管の損傷モデルを検討した。ラットに代え、分子生物学的検討がより行いやすいマウスにおいて知見を得た。また腸管膜リンパ節に加え、ショック時に全身傷害を反映する可能性がある肺においても所見を検討した。

B. 研究方法

動物種：マウス、雄、約 20g。

実験方法：マウス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。また胸腔内および肺組織の観察も行った。

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腹部正中切開を行った。盲腸の表面に 28G 針で穿刺創を作成し閉腹した。マウスは生存させ、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腹部正中切開を行い、盲腸を回盲部より末梢で結紮後 28G 針で穿刺し、腸管内容物を直径 1mm 程度に押し出してから閉腹した。マウスは生存させ、体重、活動度などを観察した。1～2日後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。また、開胸し胸腔内を観察した。肺を採取し、組織学的、分子生物学的検討を行った。

本研究で使用した Hb 小胞体は、株ニプロにて調製、物性値評価され研究用試料として配布された。

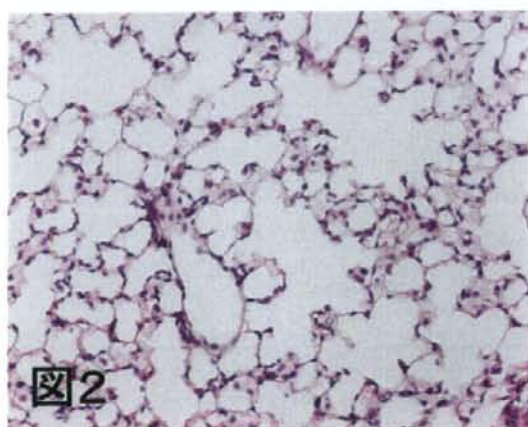
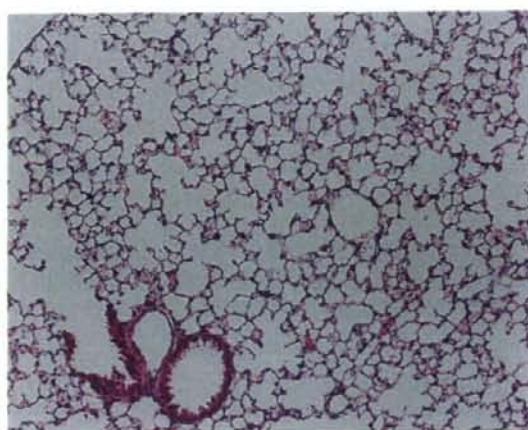
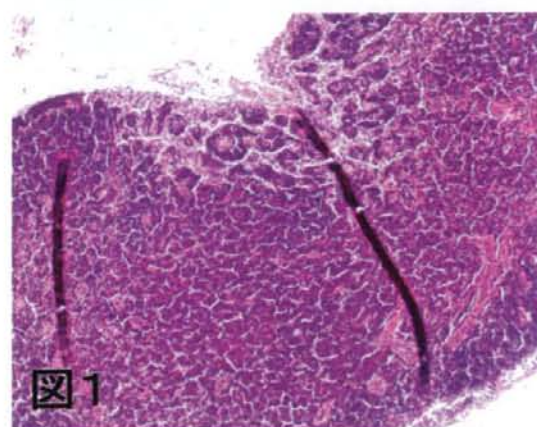
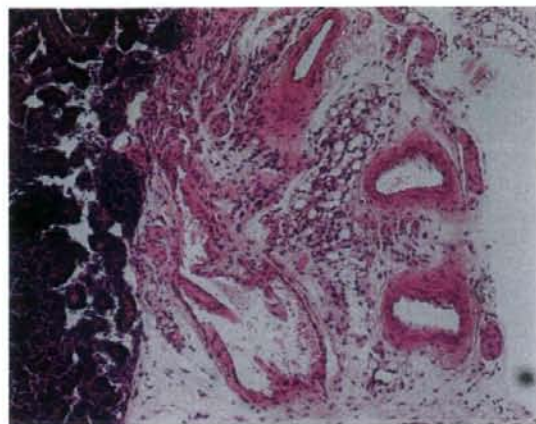
C. 研究結果・考察

実験①無処置のマウス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。ラットに比べより確認が容易であった。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マウスの活動性に著変は見られなかった。体重は一過性に減少したが、速やかに回復した。盲腸の穿刺創の修復 4～7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腹膜炎が発生しており、癒着が見られた。腹腔内に腹水が少量存在した。開腹部にも軽度の癒着が見られた。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、リンパ節腫大が見られた。培養結果は好気性培養、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マウスの活動性、食欲は実験②に比べ著名に低下した。、軟便、下痢が多くのマウスで見られた。2日目以降死亡例も見られ、実験②に比べて有意に高い実験的負荷であった。主に1日目に開腹して観察を行った。結紮部より末梢の盲腸部分は

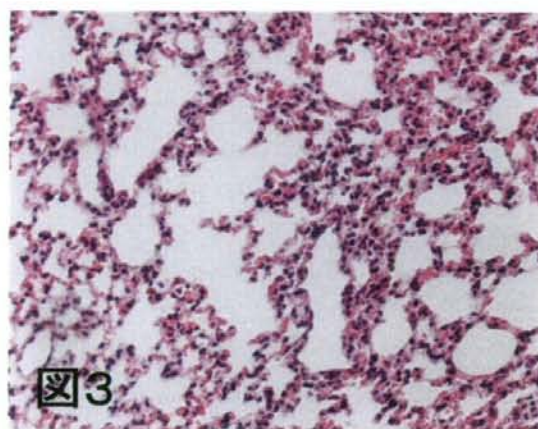
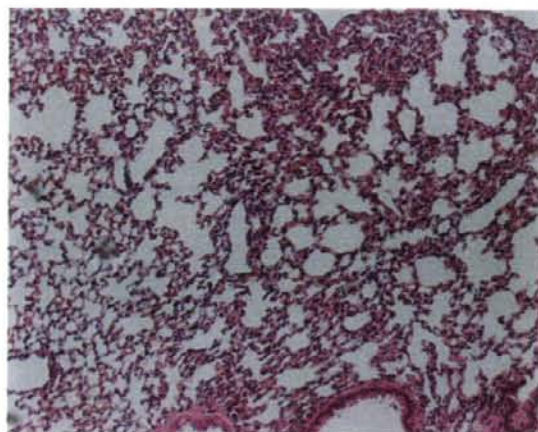
全体に黒く変色し壊死に陥っている可能性が示唆された。その周囲には限局されてはいるものの、強い腹膜炎が見られた。癒着が見られ、腹腔内に腹水が存在した。腸間膜リンパ節は腫大していたが、その程度は実験②とほぼ同等であった(図1)。



著名な肺水腫、肺胞内出血、肺胞隔壁の肥厚および白血球浸潤が見られた(図3)。

培養結果はラットを用いた実験と同様であり、好気性培養にて大腸菌、腸球菌、B群溶連菌が高率に検出された。嫌気性培養は陰性であった。

腸間膜リンパ節の所見とともに肺の所見も顕著であった。胸腔内に異常所見は無かったが、肺は肉眼的に赤みが増しており、固定時のホルマリン注入にても拡張は明らかに不良であった。肺水腫が疑われた。病理組織所見では対照群(図2)に比べ



また、肺から mRNA を抽出し解析を行った。まだ解析中であるが、neutrophilic granule protein などの好中球関連因子ならびに MMP8 といった proteinase の発現が有意に上昇している可能性が示唆された。また興味深いことに adiponectin や adipisin といった adipocytokine の著名な発現低下が見られた。

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管膜リンパ節

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。予備実験として行った腸管膜損傷を作成、修復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管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。今回行ったマウス盲腸結紮後穿刺モデルでは、顕著な限局性腹膜炎が見られ、また腸管膜リンパ節の腫大、好気性菌培養陽性所見が得られた。本実験で検討した盲腸穿刺後結紮モデルは高率に腸管膜リンパ節へ細菌移行が見られ、また敗血症を一過性にきたしている可能性もあり、SIRS を再現するモデルになり得る可能性が考えられた。このモデルにおいて人工赤血球を投与し、その影響を観察できる可能性が示唆された。また、このプロトコールにおいてサイトカイン測定を計画することが可能と考えられた。また今回の実験では腸管膜リンパ節とともに肺への影響を検討した。肺は全身状態を写す鏡となり得る臓器であり興味深い知見が得られた。特に SIRS に関連する肺障害における adipocytokine の保護的効果が最近報告されており (Nakagawa et al, Surgery, 2008)、今後検討を要する。

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管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。腸管膜リンパ節の培養では盲腸結紮後穿刺モデルにて陽性結果が得られた。また盲腸結紮後穿刺モデルでは肺に顕著な傷害が見られ、これを病理組織学的あるいは分子生物学的に評価することにより、SIRS の評価モデルとなり得る可能性が示唆された。SIRS における人工赤血球投与時に影響を評価するモデルとしての応用が考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. Kakizaki T, Kohno M, Watanabe M, Tajima A, Izumi Y, Miyasho T, Tasaka S, Fukunaga K, Maruyama I, Ishizaka A, Kobayashi K. Exacerbation of Bleomycin-Induced Injury and Fibrosis by Pneumonectomy in the Residual Lung of Mice. *J Surg Res.* 2008 (in press).
2. Tajima A, Kohno M, Watanabe M, Izumi Y, Tasaka S, Maruyama I, Miyasho T, Kobayashi K. Occult injury in the residual lung after pneumonectomy in mice. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2008;7:1114-20.
3. Kamiya K, Hayashi Y, Douguchi J, Hashiguchi A, Yamada T, Izumi Y, Watanabe M, Kawamura M, Horinouchi H, Shimada N, Kobayashi K, Sakamoto M. Histopathological features and prognostic significance of the micropapillary pattern in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2008;21:992-1001.

2. 学会発表

1. 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、酒井宏水、宗慶太郎、土田英俊、小林紘一 / 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総会 / 2008. 10 / 東京
2. 泉陽太郎、長田大雅、山田高成、小河アイリーン尚美、森崎浩、酒井宏水、堀之内宏久、武田純三、土田英俊、小林紘一 / The effect of Hemoglobin Vesicle administration on ventilator induced lung injury / 第 6 回 Current Issues on Blood Substitute research / 2008. 10 / 東京
3. 堀之内宏久、勢司泰久、河野光智、泉陽太郎、酒井宏水、土田英俊、小林紘一 / 血管損傷による制御不能出血性ショックの蘇生 / 第 15 回日本血液代替物学会総会 / 2008. 10 / 東京
4. 河野光智、竹田貴、堤恭介、池田達彦、堀之内宏久、泉陽太郎、渡辺真純、川村雅文、酒井宏水、土田英俊、小林紘一 / 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総会 / 2008. 10 / 東京