

## 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：ヘモグロビン小胞体への薬剤の吸着の検討

分担研究者	東 寛	北海道赤十字血液センター研究部長
研究協力者	藤原満博	北海道赤十字血液センター研究部研究一課長
	若本志乃舞	北海道赤十字血液センター研究部

## 研究要旨

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、臨床問題にはならないことが明らかとなった。

## A. 研究目的

人工赤血球の一つとして開発が進められているヘモグロビン小胞体 (Hemoglobin vesicles; HbV) は、Hb をリボソームに包埋させたセル型的人工酸素運搬体である。ICU でヘモグロビン小胞体を使用される場合、循環血液の 20% 程度の輸注が想定されており、大量のリボソームが血中に入ることになる。外傷や待機手術を受ける患者は、手術に際して治療剤の投与を受けることは

症に対する薬剤を服薬している場合もあると考えられる。薬剤と脂質の相互作用は薬剤の開発において重要な課題となるため、細胞膜を模擬したリボソームと薬剤の結合が検討されている。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。また臨床の場合においては血中の薬剤濃度は有効治療濃度内にあるかどうか適宜モニターさ

れる。HbV はデキストランなどの高分子凝集剤の添加によって凝集することから、血液からの一段階の遠心分離操作によって血漿や血清から HbV の分離が可能であり、この方法を用いれば血液生化学検査項目の測定値の多くが HbV に影響されないことがわかっている。そこで、HbV を含む血液検体中の薬剤濃度をこの方法で測定できるかどうかについても同時に検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### 血液検体

同意を得た健常人ドナーから抗凝固剤として EDTA-2Na を用いた採血をおこない、遠心により血漿を採取した。

### 薬剤

本検討に使用した薬剤の主たる適応と各薬剤の血中有効治療濃度の一覧を表 1 に示した。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。なお、ハロペリドールは予備的検討から最高値を終濃度として用いた。これらの薬剤はいずれもシグマ・アルドリッチより購入した。フェノバルビタールとハロペリドールはエタノールに、ジアゼパムとテオフィリンはメタノールに溶解し、その他は水に溶解した。

Table 1. 使用した薬剤の一覧

薬剤名	適応	有効治療濃度	検査法
プロプラノロール	抗不整脈剤	10~100 ng/ml	HPLC
プロカインアミド	抗不整脈剤	4~10 · g/ml	FPIA
フェノバルビタール	抗てんかん剤	10~25 · g/ml	HPLC
ジアゼパム	抗てんかん剤	200~500 ng/ml	HPLC
トブラマイシン	抗生物質製剤	6~10 · g/ml	FPIA
ゲンタマイシン	抗生物質製剤	4~10 · g/ml	FPIA
テオフィリン	喘息治療剤	10~20 · g /ml	EIA
ハロペリドール	精神神経用剤	3~17 ng/ml	金コロイド凝集法

#### 薬剤とHbVの混合条件

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 400~500 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。各薬剤の上清の濃度の検査はすべて株式会社エスアールエル (東京) に依頼した。各薬剤の測定方法については表 1 にまとめた。

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乘じた。同様に、20% HbV, 40% HbV の場合は、それぞれ 0.921, 0.842 の係数を乘じた。

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。各データは平均値±標準誤差 (N=3) で表した。

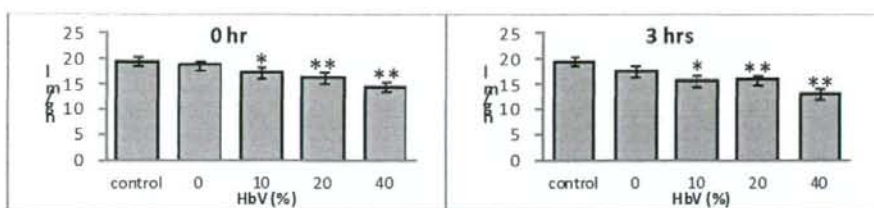


Fig. 1 プロプラノロールに対する影響 \* p<0.05, \*\* p<0.01 vs. HbV 0%

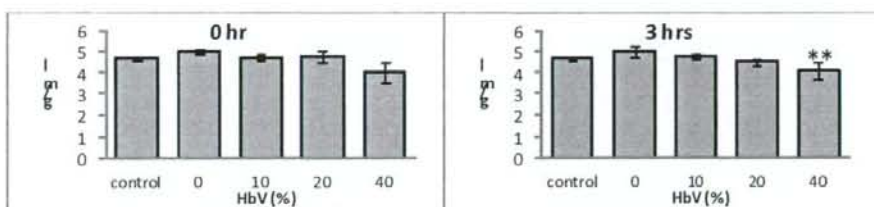


Fig. 2 プロカインアミドに対する影響 \*\* p<0.01 vs. HbV 0%

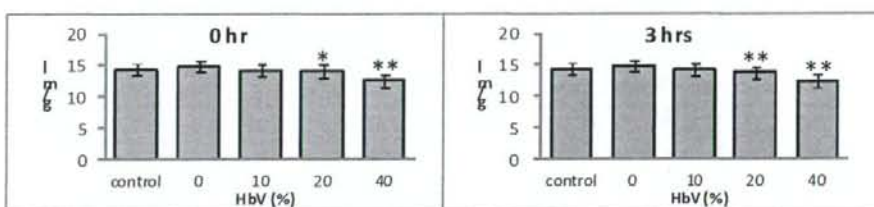


Fig. 3 フェノバルピタールに対する影響 \* p<0.05, \*\* p<0.01 vs. HbV 0%

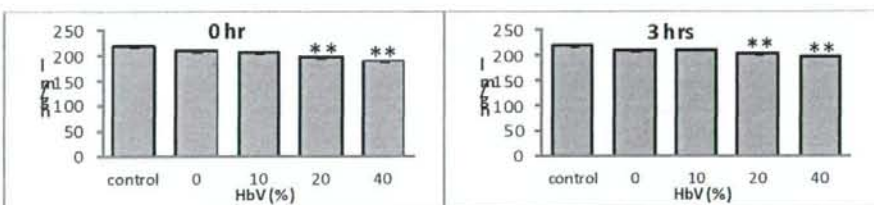


Fig. 4 ジアゼパムに対する影響 \*\* p<0.01 vs. HbV 0%

### C. 研究結果

#### プロプラノロールへの影響

HbV 10%, 20%, 40%の存在下, いずれも有意な減少がみられた。HbV 未添加と比べ, インキュベーション0時間では7.2%, 12.4%, 22.6%の減少, インキュベーション3時間では10.8%, 9.6%, 26.4%の減少であった。(Fig 1).

#### プロカインアミドへの影響

HbV 10%, 20%で5%, 8%程度の減少がみられたがいずれも有意ではなかった。一方HbV 40%の存在下では有意な減少がみられ, インキュベーション0時間では18.7%, インキュベーション3時間では19.4%の減少であった。(Fig 2).



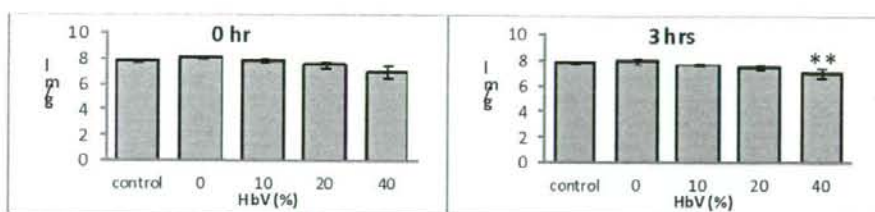


Fig. 5 トブラマイシンに対する影響 \*\* p<0.01 vs. HbV 0%

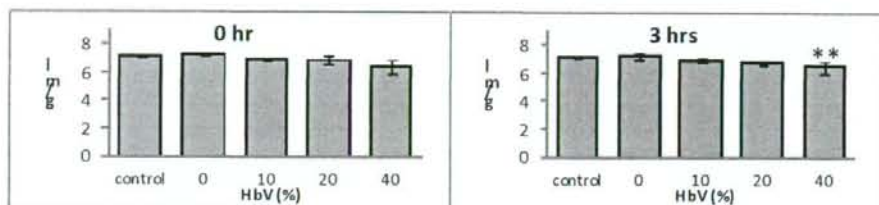


Fig. 6 ゲンタマイシンに対する影響 \*\* p<0.01 vs. HbV 0%

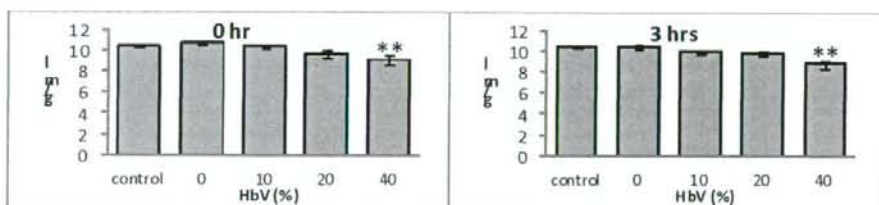


Fig. 7 テオフィリンに対する影響 \*\* p<0.01 vs. HbV 0%

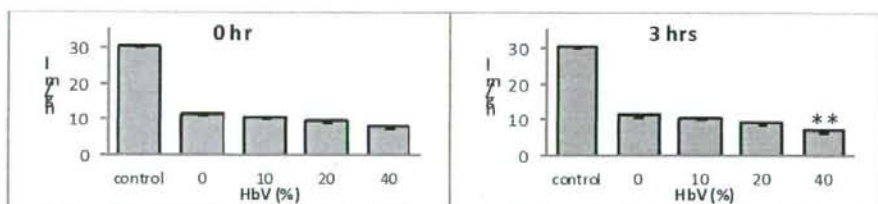


Fig. 8 ハロペリドールに対する影響 \*\* p<0.01 vs. HbV 0%

#### フェノバルビタールへの影響

HbV 20%, 40%の存在下, 有意な減少がみられた。HbV 未添加と比べ, インキュベーション 0 時間では 5.7%, 15.5%の減少, インキュベーション 3 時間では 7.4%, 16.5%の減少であった。(Fig 3).

#### ジアゼパムへの影響

HbV 20%, 40%の存在下, 有意な減少がみられた。HbV 未添加と比べ, インキュベーション 0 時間では 4.9%, 9.3%の減少, インキュベーション 3 時間で

は 3.4%, 6.8%の減少であった。(Fig 4).

#### トブラマイシンへの影響

HbV 10%, 20%, 40%と増やすにつれ, 最大 10%程度の減少がみられたが, 有意だったのはインキュベーション 3 時間での 11.3%の減少のみであった。(Fig 5).

#### ゲンタマイシンの影響

トブラマイシンと同様, HbV 10%, 20%, 40%と増

やすにつれ、最大約 10%程度の減少がみられたが、有意だったのはインキュベーション 3 時間での 10.5%の減少のみであった。(Fig 6).

#### テオフィリンへの影響

HbV 10%, 20%, 40%と増やすにつれ、最大約 15%程度の減少がみられたが、有意だったのはインキュベーション 3 時間での 15.8%の減少のみであった。(Fig 7).

#### ハロペリドールへの影響

デキストランを添加することによってハロペリドールの濃度が 1/3 に減少した。デキストラン添加させた群と比較すると、HbV 0%と比べ HbV 10%, 20%, 40%では、インキュベーション 0 時間でそれぞれ 7.2%, 9.0%, 28.2%の減少、インキュベーション 3 時間ではそれぞれ 7.3%, 17.9%, 32%の減少となった。有意な差は HbV 40%でのインキュベーション 3 時間にて見られた。(Fig 8)

#### D. 考察

臨床で広く使われている薬剤 8 種について、それぞれ既知濃度の薬剤と 10-40%の HbV とを混和することによって、薬物濃度の減少がみられるかどうか検討した。HbV と混和した直後にデキストラン凝集と遠心によって得た検体を 0 時間のものとし、HbV と 3 時間混和した後にデキストラン凝集と遠心によって得た検体を 3 時間のものとした。先ず、デキストラン凝集と遠心法の薬剤測定値への影響であるが、ハロペリドール以外の 7 薬剤については、薬剤の濃度測定に干渉作用は見られず、臨床の場合において使用可能であることが示された。一方、ハロペリドールは、他の薬剤と異なり、デキストラン凝集法と遠心法が、薬剤の濃度測定に干渉作用し、実際の濃度より 1/3 になることから本法はハロペリドールの測定には不適であることが示された。HbV が血液検体を用いた生化学検査、凝固系検査、免疫学的検査を行ううえで干渉作用を示し、デキストラン凝集法と遠心法によって HbV を除去することで、多くの検査値において影響しなくなることが報告されている。しかしながら、

デキストランを添加することによるリボプロテインおよび von Willebrand factor 活性の低下が知られている。これらの項目ならびに今回のハロペリドールの測定値がデキストラン添加によって低値になる理由はいまのところ不明である。これらの項目において共通するのは、いずれも凝集法を用いている点であり、凝集作用のあるデキストランが少なからず影響するかもしれない。この点について、今後検討する必要がある。

今回測定した薬剤への HbV の影響をみると、少なからずどの薬剤においても、HbV の濃度に依存して薬物濃度が減少したことから、Hb を内包するリボソームに薬剤が吸着またはリボソーム内への侵入等の相互作用をしていると考えられた。しかしながら、HbV 20%までは、3 時間のインキュベーションにおいても、統計的な有意差を示す場合もあるものの、その減少の程度は約 10~20%であった。従って循環血液の 20%の HbV の臨床使用であれば、有効治療濃度の 10~20%増しを維持できる様に投薬すれば問題はないと考えられた。HbV 40%においては、3 時間のインキュベーションにていずれも有意な減少となった。その程度は、薬剤によって異なったが、プロプラノロールおよびハロペリドールで高く約 30%の減少であったが、この減少分もあらかじめ考慮して投与すれば大きな問題とはならないと考えられた。

#### E. 結論

今回、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 と混和した。HbV を除去するためにデキストラン添加と遠心法を組み合わせた簡易法を用いたが、ハロペリドールでは濃度が低値となり、干渉を受けることから注意を要する。それ以外の薬剤では、測定値に影響はみられず、多くの薬剤の濃度検査に応用できる。10%または 20% HbV と今回用いた薬剤の混和では、薬剤濃度の減少は約 10~20%であり、薬剤と HbV の相互作用は僅かであると示唆される。また、いずれの薬剤においても 40% HbV では有意な減少が見られたが、最大でも 30%であり、臨床的には投

与量で十分に調整しうると考えられる。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Azuma H, Ikeda H. Biocompatibility study of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, with human umbilical cord hematopoietic stem/progenitor cells using an in vitro expansion system. *ASAIO J* (in press)

Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Azuma H, Ikeda H. Influence of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells in vitro. *J Biomed Materials Res A* 88:34-42, 2009.

藤原満博, 東 寛, 池田久實. ヘモグロビン小胞体の in vitro におけるヒト血液細胞および血漿タンパクへの適合性. *人工血液* 16:212-220, 2008.

### 2. 学会発表

Azuma H, Abe H, Takahashi D, Fujihara M, Sakai H, Sou H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Ikeda H. Transient induction of immune-suppressor cells in rat spleen by massive injection of hemoglobin-vesicles (HbV). The 6<sup>th</sup> Current Issues on Blood Substitute Research (Tokyo).

藤原満博, 東 寛, 山口美樹, 高橋大輔, ヘモグロビン小胞体 (HbV) の in vitro におけるヒト造血幹/前駆細胞への影響. 第15回日本血液代替物学会年次大会 シンポジウム (輸血代替としての利用法) (東京).

ヘモグロビン小胞体が免疫系に及ぼす影響. 高橋大輔, 藤原満博, 東 寛, 宋 慶太郎, 酒井宏水, 土田英俊, 池田久實. 第15回日本血液代替物学会年次大会 (東京).

## H. 知的財産の出願・登録状況

### 1. 該当無し



平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金 政策創薬総合研究事業  
 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： Hb 小胞体投与によるパルスオキシメータ計測への干渉作用

分担研究者	宗 慶太郎	早稲田大学 理工学研究所	准教授
研究協力者	土田 英俊	早稲田大学 理工学研究所	顧問研究員（早稲田大学 名誉教授）
	酒井 宏水	早稲田大学 理工学研究所	准教授
	長田 大雅	慶應義塾大学医学部 麻酔科	助教

### 研究要旨

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ている。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。本年度は 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ので報告する。

### A. 研究目的

パルスオキシメータは経皮的に動脈血酸素飽和度（SpO<sub>2</sub>）が測定できる医療機器として日本光電の青柳らにより開発された（1974 年）。センサーを指先に装着するだけで経皮的・非侵襲的な測定ができるため、麻酔管理や手術中、ICU での患者のモニターなど救命救急、集中治療の現場で日常的に使用され、その有用性も広く認知されている。

平成 18 年度の厚生労働科学研究により、従来の 2 波長型パルスオキシメータでは、Hb 小胞体投与により酸素飽和度が過小評価されることが解っている。2 波長型のパルスオキシメータに比較して 4 波長型のパルスオキシメータ（開発品）では Hb 小胞体投与による干渉作用が軽減されることから、多波長パルス分光法により干渉作用を回避できる可能性を見出している。最近では、MetHb 含量、COHb 含量、Hb 含量などを測定できる多波長型パルスオキシメータが開発され（図 1）、これらの機

種が臨床現場に導入されつつある。本年度は 8 波長型のパルスオキシメータで動脈血酸素飽和度に加え、MetHb 含量、COHb 含量のモニターにおける Hb 小胞体の干渉作用について検討した。

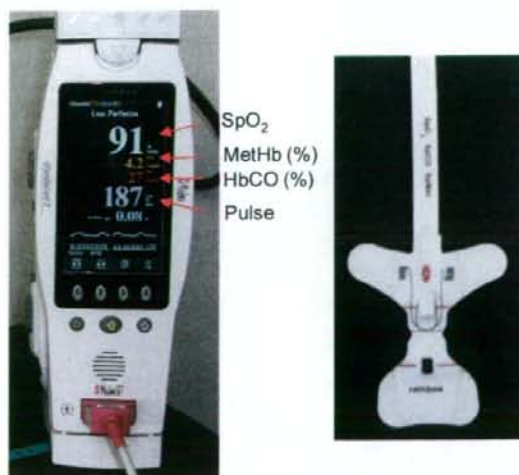


図 1 パルスオキシメータ（Radical-7, Masimo 社製）のモニター部とセンサー部



## B. 研究方法

慶應義塾大学麻酔科(武田純三 教授、長田大雅 助教)にて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、2.0~2.5 kg)を使用した。麻酔および人工呼吸器の装着の詳細条件については別添 4-1.1 分担研究報告(武田純三教授)を参照されたい。

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(図 2)、動脈血酸素飽和度( $SpO_2$ )、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 10ml/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、 $SpO_2$ 、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。



図 2. 粘着センサーの装着場所

## C. 研究結果・考察

60%交換直後の採血液を遠心分離したところ、血漿中には Hb 濃度にして 6.4g/dL の Hb 小胞体が浮遊していた。60%交換直後に血漿中に浮遊する Hb 小胞体の Hb 濃度は理論値として約 6g/dL と算出されることから、循環血液量の 60%相当が Hb 小胞体に置換されていることを確認した。Hb 濃度は経時的に低下していくものの、4 時間後でも Hb 濃度にして 5.8g/dL の Hb 小胞体が残存することから、投与量の 91%が 4 時間後に循環していると見積もられる(図 3)。従って、Hb 小胞体投与後 4 時間まではほぼ一定量の Hb 小胞体が循環しているため、Hb 小胞体量に依存する干渉作用の変動は少ないと考えられる。

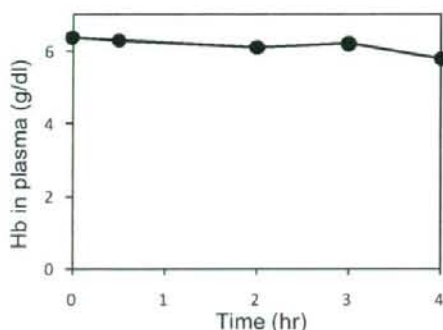


図 3. Hb 小胞体由来の Hb の血漿中濃度の推移

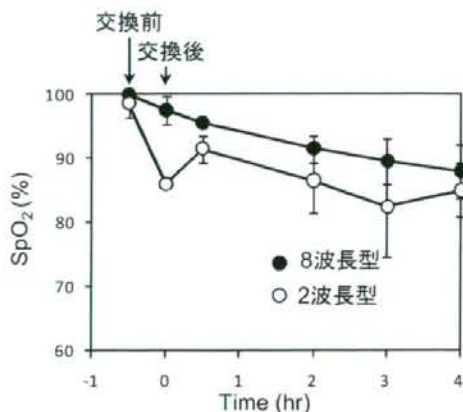


図 4. 動脈酸素飽和度 ( $SpO_2$ ) のモニター値推移

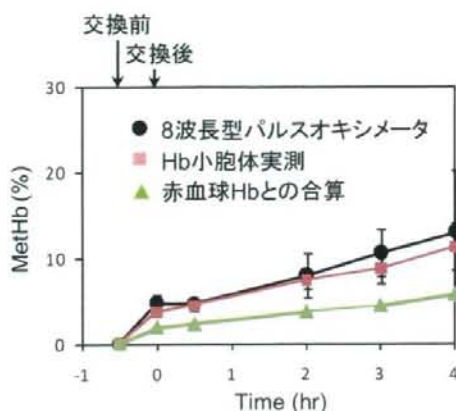


図 5. MetHb 含量のモニター値推移

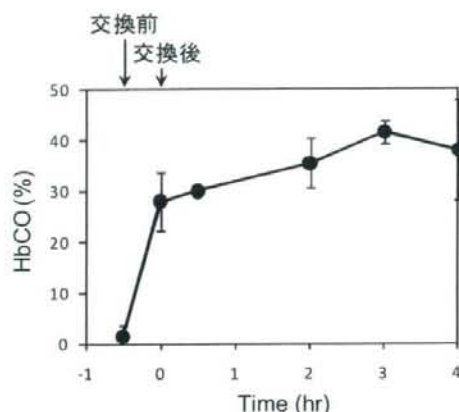


図 6. HbCO 含量のモニター値推移

図 4, 5, 6 にパルスオキシメータでモニターした  $SpO_2$ 、MetHb、HbCO の推移を示す。8 波長型パルスオキシメータでモニターした  $SpO_2$  は Hb 小胞体による交換輸血前に 100% で、交換輸血直後で 97.5% であった。60% の交換輸血前後で 2.5% 程度の相違しか認めないことから Hb 小胞体投与による干渉作用は軽微と考えられる。 $SpO_2$  は経時的に低下し、Hb 小胞体投与から 4 時間後で 88% まで低下した。従来のパルスオキシメータ (2 波長型) では交換直後に 86% まで低下し、8 波長型でのモニター値に比較して不安定な推移を示すことから、本検討からも従来検討のように  $SpO_2$  を過小評価することが示された。また、2 波長型でも経時的に

$SpO_2$  が低下する傾向を認めた。 $SpO_2$  の低下として 2 つの理由が考えられた。一つは本モデルでは人工換気による肺障害を誘発させているため、肺での酸素化の問題を反映している可能性がある。もう一つは酸素化できないメト Hb 含量の増大である。

図 5 に示すようにパルスオキシメータでモニターされる MetHb 含量は時間と共に増大していく。Hb 小胞体のメト化率の推移は図 5 に示すようにパルスオキシメータでモニターされる MetHb 含量と同様の推移を示した。しかし、実際にはパルスオキシメータでモニターされるのは赤血球由来の Hb を含めた MetHb 含量であるため、この補正を行うとパルスオキシメータでは MetHb 含量を若干過大評価していると考えられる。投与から 4 時間後の全 Hb に占める MetHb は 5.7% であるため、94% 程度までの  $SpO_2$  の低下は MetHb の増大から説明できる。実際には、パルスオキシメータで計測される  $SpO_2$  は 88% まで低下しているため、人工呼吸器の装着による肺障害の影響も反映している可能性がある。今回の実験では  $SpO_2$  に影響すると考えられるメト化と肺障害の二つの因子が経時的に変動しているが、正常動物に所定量の MetHb 小胞体を投与してパルスオキシメータでの  $SpO_2$  と MetHb 含量のモニター値の整合性を分析するなどの検討により、 $SpO_2$  のモニター精度に関しより詳細な知見が得られるものと考えられる。

図 6 に示すように Hb 小胞体による交換前に 1.5% であった HbCO 含量は、交換後に 28% まで増大した。Hb 小胞体の HbCO 含量が 2% 以下であることから、HbCO に関しては過大評価されることが明らかになった。

#### D. 結論

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 SpO<sub>2</sub> 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。

## 謝辞

パルスオキシメータの試用に協力いただいたマシモジャパン(株)に感謝致します。

## E. 研究発表

### 1. 発表論文

1. 宗 慶太郎, 小峰梨沙, 酒井宏水, 小林紘一, 土田英俊, 村田 満, “ヘモグロビン小胞体を含む血液検体の臨床検査-デキストラン添加による干渉作用の回避-”, *人工血液*, 17, (2009). (in press)
2. E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, K. Kobayashi, “Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes based on bioconjugate chemistry” *Bioconjugate Chemistry* 20, (2009). (in press)
3. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, “Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers” *Artificial Organs* 33,139-145 (2009).
4. 宗 慶太郎 “トピックス:ヘモグロビン内包リポソームによる脳への酸素供給:出血性ショックラットモデルでの PET イメージングによる評価”, *人工血液*, 16, 169-174 (2008).

### 2. 学会発表

1. K. Sou, H. Sakai, E. Tsuchida / Electrostatics and

complement activation on the surface of phospholipid vesicles containing acidic lipids / 11<sup>th</sup> Liposome Research Days Conference / 2008.7.19-22 / Yokohama.

2. 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 rats spleen by massive injection of hemoglobin-vesicle (HbV) / The 6<sup>th</sup> Current Issues on Blood Substitute Research / 2008.10.24-25 / Tokyo.
3. H. Sakai, K. Sou, Y. Izumi, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicle, a Cellular Hb-based Oxygen Carrier, Fulfills the Physiological Roles of the RBC Structure / The 6<sup>th</sup> Current Issues on Blood Substitute Research / 2008.10.24-25 / Tokyo.
4. 宗 慶太郎, 酒井宏水, 土田英俊 / ヘモグロビン小胞体の表面荷電基の特徴 / 第 15 回日本血液代替物学会 / 2008 年 10 月 / 東京
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 / 2008 年 10 月 / 東京
6. 高橋大輔, 藤原満博, 東 寛, 宗 慶太郎, 酒井宏水, 堀之内宏久, 小林紘一, 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 / 2008 年 10 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：マウス脱血モデルに対する人工赤血球投与による影響の検討

分担研究者

富田 裕	慶應義塾大学医学部	神経内科・脳血管障害予防医学講座	助教
鳥海春樹	慶應義塾大学医学部	神経内科	大学院博士課程学生
畝川美悠紀	慶應義塾大学医学部	神経内科	助教
服部英典	慶應義塾大学医学部	神経内科	助教
富田 稔	慶應義塾大学医学部	神経内科	客員教授
鈴木則宏	慶應義塾大学医学部	神経内科	教授

研究要旨

本研究ではマウス脱血モデルに対する人工赤血球投与による影響を検討したので報告する。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、0.3-0.5 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。その結果、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微小脳循環障害を改善する可能性が示唆された。

A. 研究目的

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。

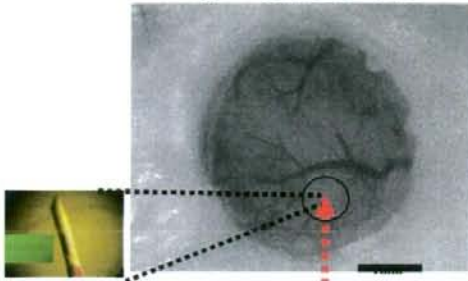
しかし、出血性ショック時の Hb 小胞体投与による脳微小循環に与える影響はいまだ不明である。本研究では、これまでに我々が確立したマウス *in vivo* 実験系 (2-5) において、マウス脱血後の人工赤血球投与による影響を検討した。

B. 研究方法

8-12 週齢、体重 22-25g の C57BL/6J マウスを用いた。投与量を微調整することができる小動物用

麻酔器（バイオリサーチ）を用いて、イソフルレン麻酔下、C57BL/6J マウス(n=8)の頭蓋骨を定位固定装置に固定、左頭頂側頭葉にて頭蓋骨を開け(2-5)、硬膜は温存した。脳表左中大脳動脈分岐部に酸素電極（栄行科学）を固定（Fig.1）し、組織酸素分圧測定器および Power Lab®（AD Instruments）を用いて、脳表の酸素分圧（PO<sub>2</sub>）変化を連続的にモニタした。

Fig. 1 酸素電極の固定



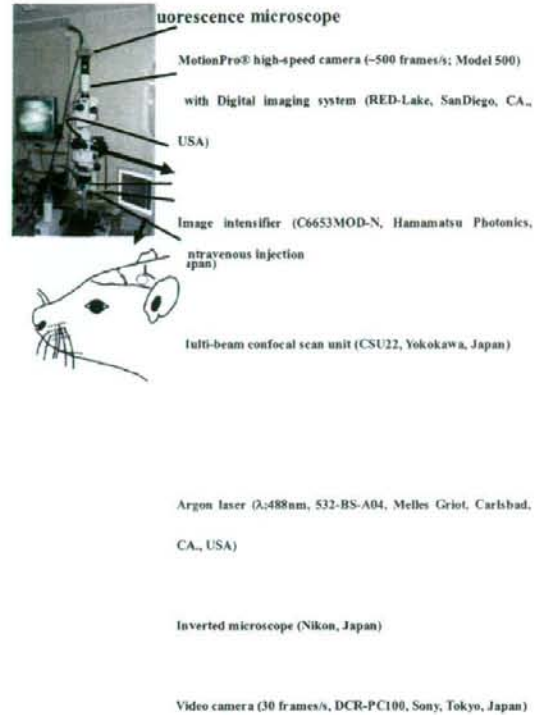
脳表左中大脳動脈分岐部に直径0.2mmの被膜needle

タイプの酸素電極（栄行科学）を固定。Power Lab®（AD Instruments）に接続し連続記録。

一方、小動物用血圧計（室町機械）にて、全身血圧を持続的にモニタした。FITC ラベル赤血球、および人工赤血球注入のため、尾静脈にカテーテルを挿入し、また脱血用に右大腿動脈カテーテルを挿入した。ここで 0.3-0.5ml の動脈血を脱血後、同量の生理食塩水（n=3）あるいは人工赤血球 1）（n=5）を全身投与した。脳皮質の約 50 μm の深さにおける関心領域（ROI）の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（500 frames/s）共焦点レーザー顕微鏡（λ=488 nm）（Fig.2）を用いて観察、連続記録した(6,7)。

Fig. 2

High-speed camera laser-scanning confocal



その後、人工赤血球を投与後の脳表の変化、酸素分圧変化を観察・記録した。さらに、各段階における ROI の微小血流速度（2D flow maps）を血液希釈法に基づく KEIO-IS1 8,9)にて解析した。

C. 研究結果・考察

各脱血後、微小血管内の赤血球の速度低下、停滞などの in vivo 画像所見を得た（Fig.3）。

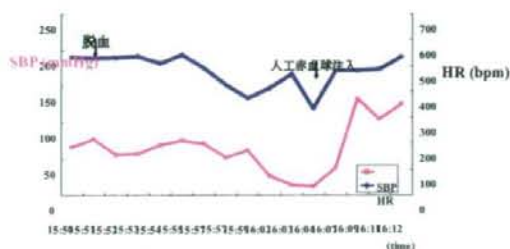
Fig. 3 脱血前・後の脳微小循環動態の in vivo 経時変化



脱血後、脳微小血管内の赤血球の速度低下、停滞（矢印）などの所見を得た。

全身収縮期血圧・脳表の酸素分圧のコントロール値は各々、 $80.5 \pm 15.5 \text{ mmHg}$ 、 $32.9 \pm 4.1 \text{ mmHg}$ であり、脱血後  $25.6 \pm 5.6 \text{ mmHg}$ 、 $22.9 \pm 2.9 \text{ mmHg}$ へと有意に減少 ( $P < 0.05$ )した (Fig.4)。

Fig. 4 心拍数 (HR) および収縮期血圧 (SBP) の経時的変化

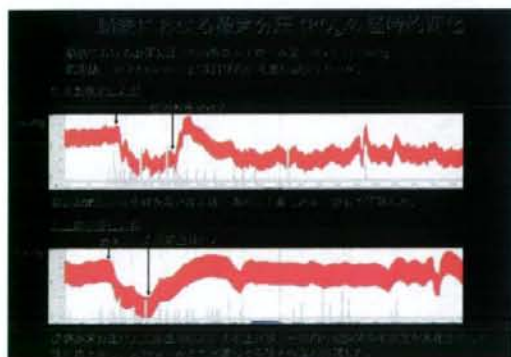


SBPのコントロール値： $80.5 \pm 15.5 \text{ mmHg}$

脱血後のSBPの平均値： $25.6 \pm 5.6 \text{ mmHg}$  ( $n=8$ , 統計学的に有意な減少  $P < 0.05$ )

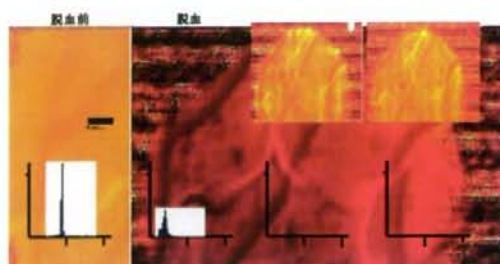
\*呼吸回数には統計学的に有意な変動なし。

脱血後の生理食塩水注入群では、脳表酸素分圧は一過性に上昇したが、数分で下降した。一方、脱血後の人工赤血球注入群では、脳表酸素分圧は上昇後、一時的な数分間の不安定な変化を示した後、元のレベルまで回復しその後その値が持続した (Fig.5)。



ROIの平均微小血流量速度は、脱血により低下し、人工赤血球投与により回復し、その後持続した (Fig.6)。

Fig. 6 KEIO-IS1による2D flow maps および histograms の解析



上図：各時間におけるROI (50X50のマトリクス) の速度成分マッピング。

下図：各々の速度成分の出現頻度を示すヒストグラム。

ROIの平均微小血流量速度は、脱血により低下し、人工赤血球投与により回復・持続した。

次年度以降、各群における赤血球密度/速度の Matlab 応用ソフト (KEIO-IS 2) を用いたより詳細な解析、MRI・組織切片の解析などによる梗塞体積の比較などを実施し、人工赤血球投与により微小循環が改善したのか否か明らかにしていく必要があると考えられた。

#### D. 結論

マウス脱血後の人工赤血球投与による影響を検討した。出血性ショックの際に、脳微小循環障害回避のため人工赤血球投与が有用である可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1-Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K. One-year observation of Wistar rats after intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers). *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 35: 81-91, 2007.
- 2-Tomita Y, Kubis N, Calando Y, Tran Dinh A, Meric P, Seylaz J, Pinard E. Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 25: 858-867, 2005.
- 3-Rivière C, Martina MS, Tomita Y, Wilhelm C, Tran Dinh A, Ménager C, Pinard E, Lesieur S, Gazeau F,



- Seylaz J. Magnetic targeting of nanometric magnetic fluid loaded liposomes to specific brain intravascular areas: a dynamic imaging study in mice. *Radiology*. 244: 439-448, 2007.
- 4-Tran Dinh A, Kubis N, Tomita Y, Karaszewski B, Calando Y, Oudina K, Petite H, Seylaz J, Pinard E. In vivo imaging with cellular resolution of bone marrow cells transplanted into the ischemic brain of a mouse. *Neuro Image*. 31: 958-968, 2006.
- 5-Kubis N, Tomita Y, Planat V, Tran Dinh A, Planat-Bernard V, André M, Karaszewski B, Waekel L, Pénicaud L, Silvestre J-S, Casteilla L, Seylaz J, Pinard E. Vascular fate of adipose tissue-derived adult stem cells in the ischemic murine brain : an in vivo imaging study. *Neuro Image*. 34: 1-11, 2007.
- 6-Tomita M, Osada T, Istvan S, Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Tanahashi N, Suzuki N. Automated method for tracking vast numbers of FITC-labeled RBCs in microvessels of rat brain in vivo using a high-speed confocal microscope system. *Microcirculation*. 15: 163-174, 2008.
- 7-Unekawa M, Tomita M, Osada T, Tomita Y, Toriumi H, Tatarishvili J, Suzuki N. Frequency distribution function of RBC velocities in single capillaries of the rat cerebral cortex using intravital confocal microscope with high-speed camera. *Asian Biomed*. 2: 203-218, 2008.
- 8-Schizler I, Tomita M, Fukuuchi Y, Tanahashi N, Inoue K. New optical method for analyzing cortical blood flow heterogeneity in small animals: validation of the method. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 279: H1291-1298, 2000.
- 9-Tomita Y, Tomita M, Schizler I, Amano T, Tanahashi N, Kobari M, Takeda H, Ohtomo M, Fukuuchi Y. Moment analysis of microflow histogram in focal ischemic lesion to evaluate microvascular derangement after small pial arterial occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 22: 663-9, 2002.
- E. 健康危険情報**  
該当なし
- F. 研究発表**
1. 発表論文
1. Unekawa M, Tomita M, Osada T, Tomita Y, Toriumi H, Tatarishvili J, Suzuki N. Frequency distribution function of RBC velocities in single capillaries of the rat cerebral cortex using intravital confocal microscope with high-speed camera. *Asian Biomed*. 2: 203-218, 2008.
2. 学会発表
1. Tomita Y, Toriumi H, Tatarishvili J, Tomita M, Unekawa M, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Suzuki N / Effect of artificial RBCs on murine hemorrhagic shock model. / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / 2007.10 / Tokyo.
2. Tomita M, Tomita Y, Osada T, Unekawa M, Toriumi H, Tatarishvili J, Suzuki N. / Facilitation of FITC-labeled RBC movement along single capillaries: role of glia? / Gordon Conference, Brain Energy Metabolism and Blood Flow / 2008.8 / Andover.

## 別添 5

表 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
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.	2008年4月	Elsevier	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
Neural Mechanisms of Sevoflurane-induced Respiratory Depression in Newborn Rats. Anesthesiology. 109(2):233-242, 2008.	2008年4月	真興交易医書出版部	Kuribayashi, Junya, Sakuraba, Shigeki, Kashiwagi, Masanori, Hatori, Eiki, Tsujita, Miki, Hosokawa, Yuki, Takeda, Junzo, Kuwana, Shun-ichi.
Cardioprotective effects of nicorandil in patients undergoing on-pump coronary artery bypass surgery. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2008 22(4):548-53.	2008年7月	じほう	Yamamoto S, Yamada T, Kotake Y, Takeda J.
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	2008年7月	日本臨床麻酔学会	矢島 聡、森崎 浩、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 ー硬膜外鎮痛とIVPCA の比較ー臨床麻酔。33(1):23-29, 2009	2009年1月	メディカルレビュー社	木下智恵、小杉 志都子、橋口さおり、津崎晃一、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.	2008年10月	Elsevier	中塚逸央、武田純三
Hypercapnic acidosis minimizes endotoxin-induced gut mucosal injury in rabbits. Intensive Care Med (2009) 35:129-135	2008年10月	Lippincott Williams&Wilkins	Hiroshi Morisaki, Satoshi Yajima, Yoko Watanabe, Takeshi Suzuki, Michiko Yamamoto, Nobuyuki Katori, Saori Hashiguchi, Junzo Takeda.
Difference in autologous blood transfusion-induced inflammatory responses between acute normovolemic hemodilution and preoperative donation. J Anesth (2009) 23:61-66	2008年5月	Mosby, Inc	Yoshifumi Kotake, Michiko Yamamoto, Midori Matsumoto, Takashige Yamada, Hiromasa Nagata, Hiroshi Morisaki and

			Junzo Takeda.
An individualized recruitment maneuver for mechanically ventilated patients after cardiac surgery. <i>J Anesth</i> (2009) 23:87-92	2009年1月	Spandidos Publications Ltd.	Ryohei Serita, Hiroshi Morisaki and Junzo Takeda.
Recurrent ST-segment elevation on ECG and ventricular tachycardia during neurosurgical anesthesia. <i>J Anesth</i> (2009) 23:115-118.	2008年12月	Texas Heart R Institute, Houston	Yoshifumi Kotake, Midori Matsumoto, Tomoko Yorozu and Junzo Takeda.
Exacerbation of Bleomycin-Induced Injury and Fibrosis by Pneumonectomy in the Residual Lung of Mice. <i>J Surg Res.</i> 2008 (in press).	印刷中	Elsevier	Kakizaki T, Kohno M, Watanabe M, Tajima A, Izumi Y, Miyasho T, Tasaka S, Fukunaga K, Maruyama I, Ishizaka A, Kobayashi K.
Occult injury in the residual lung after pneumonectomy in mice. <i>Interact Cardiovasc Thorac Surg.</i> 2008;7:1114-20.	2008年12月	日本心臓財団	Tajima A, Kohno M, Watanabe M, Izumi Y, Tasaka S, Maruyama I, Miyasho T, Kobayashi K.
Histopathological features and prognostic significance of the micropapillary pattern in lung adenocarcinoma. <i>Mod Pathol.</i> 2008;21:992-1001.	2008年7月	Springer Japan	Kamiya K, Hayashi Y, Douguchi J, Hashiguchi A, Yamada T, Izumi Y, Watanabe M, Kawamura M, Horinouchi H, Shimada N, Kobayashi K, Sakamoto M.
Influence of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells in vitro. <i>J Biomed Materials Res A</i> 88:34-42, 2009.	2009年2月	中外医学社	Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Azuma H, Ikeda H.
ヘモグロビン小胞体の in vitro におけるヒト血液細胞および血漿タンパクへの適合性. <i>人工血液</i> 16:212-220, 2008.	2008年9月		藤原満博, 東 寛, 池田久實.
"Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes based on bioconjugate chemistry" <i>Bioconjugate Chemistry</i> 20, (2009). (in press)	印刷中		E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, K. Kobayashi,
"Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers" <i>Artificial</i>	印刷中		H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida,



Organs 33,139-145 (2009).			
“トピックス:ヘモグロビン内包リボソームによる脳への酸素供給:出血性ショックラットモデルでの PET イメージングによる評価”, 人工血液, 16, 169-174 (2008).	2008 年 12 月		宗 慶太郎
Frequency distribution function of RBC velocities in single capillaries of the rat cerebral cortex using intravital confocal microscope with high-speed camera. Asian Biomed. 2: 203-218, 2008.	2008 年 6 月	Elsevier	Unekawa M, Tomita M, Osada T, Tomita Y, Toriumi H, Tatarishvili J, Suzuki N WT

研究成果の刊行物・別冊  
(2008.4～2009.3)

Original article

## Neutrophil elastase and systemic inflammatory response syndrome in the initiation and development of acute lung injury among critically ill patients

Seitaro Fujishima<sup>a,\*</sup>, Hiroshi Morisaki<sup>b</sup>, Akitoshi Ishizaka<sup>c</sup>, Yoshifumi Kotake<sup>b</sup>, Masaru Miyaki<sup>a</sup>, Kikuo Yoh<sup>a</sup>, Kazuhiko Sekine<sup>a</sup>, Junichi Sasaki<sup>a,1</sup>, Sadatomo Tasaka<sup>c</sup>, Naoki Hasegawa<sup>c</sup>, Yohko Kawai<sup>d,2</sup>, Junzo Takeda<sup>b</sup>, Naoki Aikawa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Emergency and Critical Care Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>b</sup> Department of Anesthesiology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

<sup>c</sup> Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

<sup>d</sup> Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

Received 26 June 2007; accepted 4 July 2007

Available online 31 July 2007

### Abstract

Critically ill patients are commonly associated with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and are at a greater risk of developing acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). Under these conditions, large amounts of various cytokines are produced, which either directly or indirectly induce tissue injury and finally organ dysfunctions, through the activation of neutrophils and as a result of release of cytotoxic molecules, especially neutrophil elastase (NE). In the present study, we determined plasma neutrophil elastase–alpha-1 antitrypsin complex (NE–AT) and elastase digests of cross-linked fibrin (e-XDP) in critically ill patients to elucidate the significance of NE in the initiation and progression of ALI and ARDS in the presence or absence of SIRS. We found significantly increased levels of plasma NE–AT in the patients with ARDS, especially when the definition of SIRS was met. Among ALI/ARDS groups, plasma NE–AT, but not e-XDP, correlated significantly with the decrease in PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> ratio and the duration of ALI/ARDS. Furthermore, NE–AT, but not e-XDP, significantly increased in subgroups whose PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> ratio decreased by more than 20%. Such correlations and differences between the subgroups were not observed in the non-ALI patients. From these results, we speculate that NE–AT, but not e-XDP, may be predictive of progressive lung injury in the early stage of ALI and ARDS.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** SIRS; ALI; ARDS

### 1. Introduction

Patients in a critical condition, especially those suffering from severe sepsis, are commonly associated with systemic

inflammatory response syndrome (SIRS) [1]. These patients are at greater risk of developing multiple organ dysfunction syndrome (MODS), including acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS), which is currently the major determinant of their prognosis [2]. However, there is only a small fraction of the available evidence for the treatments [3], such as early fluid resuscitation [4], tight glucose control [5], activated protein C [6] for severe sepsis and low tidal volume ventilation for ALI/ARDS [7]. There is therefore a clear need to accumulate further clinical evidence for sepsis and septic ALI/ARDS is being awaited.

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3225 1323; fax: +81 3 3353 2232.

E-mail address: [fujishim@sc.itc.keio.ac.jp](mailto:fujishim@sc.itc.keio.ac.jp) (S. Fujishima).

<sup>1</sup> Present address: Division of Emergency Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

<sup>2</sup> Present address: International University of Health and Welfare, Department of Preventive Health Examination Center in Sanno Hospital, Tokyo, Japan