

200908017A

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定と  
GMP 製造技術の確立

(研究課題番号 : H21-政策創薬-一般-006)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀之内 宏久  
(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 22 (2010) 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

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定と  
GMP 製造技術の確立

(研究課題番号 : H21-政策創薬-一般-006)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堀之内 宏久  
(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 22 (2010) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	1
堀之内 宏久 (慶應義塾大学 医学部 外科 准教授)	
II. 分担研究報告書	
1. 堀之内 宏久 (慶應義塾大学 医学部 外科 准教授)	8
2. 小林 紘一 (慶應義塾大学 医学部 外科 名誉教授)	16
3. 池田 久實 (北海道赤十字血液センター 所長)	23
4. 小田切 優樹 (熊本大学大学院 医学薬学研究部 教授)	28
5. 高折 益彦 (東宝塚さとう病院 名誉院長 / 川崎医大名誉教授)	39
6. 土田 英俊 (早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員 / 早大名誉教授)	42
7. 酒井 宏水 (早稲田大学 理工学研究所 准教授)	60
8. 甲斐 俊哉 (ニプロ(株) 医薬品研究所 所長)	75
9. 高野 久輝 (ニプロ(株) 人工臓器開発センター センター長)	82
10. 大鈴 文孝 (防衛医科大学校 内科学教室 教授)	87
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	97
IV. 研究成果の刊行物・別冊	101

## 人工酸素赤血球の臨床応用を目指した至適投与条件の策定とGMP製造技術の確立

研究代表者 堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 准教授

## 研究要旨

われわれが開発研究を進めているヘモグロビン小胞体(以下HbVと記す)は期限切れとなった献血血液よりヘモグロビンを高度に分離精製、濃縮し、脂質2重膜で被覆したリポソーム製剤である。本研究ではHbVを臨床応用するために現在まで行ってきた検討結果を踏まえ、投与の至適条件を検討し、GMP製造技術を確立することを目的としている。

HbVはリポソーム製剤であり、通常のリポソーム製剤と異なる膜組成により、血液成分との相互作用を極小化するように設計されている。大量のHbVを急速に輸液しても、輸血に劣らない蘇生効果と安全性が認められるかについて検討する必要がある。また、これらの検討を通して、輸注量及び輸注スピードに制限を設けるべきかについては臨床応用以前に検討をすべきである。また、単純な出血の症例だけでなく、外傷により組織が挫滅に陥った症例、敗血症性ショックを伴った症例、SIRS (Systemic inflammatory response syndrome) を合併する症例、肝代謝の傷害された症例にも使用する可能性が高い。これらの病態では、血中のサイトカインの産生増加や酸素ラジカルの増加などが報告されており、このような血中の変化によりHbVの血中滞留時間の減少やヘモグロビンのメト化による酸素運搬能の減少などが予想され、HbVがどの程度効果を持続させうるかについて検討する必要がある。また、現在までの開発研究で達成した量のHbVの製造量では臨床応用に耐えうるGMP製剤を持続的に製造し続けることは困難と考えられ、製造工程のスケールアップやGMPに即した製造工程の整備が必須である。以上の視点を踏まえ、本年度われわれはHbVの大量投与の方法と標準化、急速投与の標準化、大量使用の際の代謝系の変動及び病的状態下での代謝、虚血臓器（心筋）におけるHbVの保護効果についての解析、肝障害時のHbVの体内動態における代謝遅延の機序解明、製造試料の無菌化法の開発、HbV混入血液の臨床検査における電解質測定の影響原因についての検討、HbVと代用血漿製剤との相互作用の解析、HbVによる皮弁内虚血領域の創傷治癒効果、ブタを用いる疑似アレルギー反応の有無の検討などを検討した。

動物投与試験の結果、① 組織崩壊を伴う外傷として挫滅症候群を想定したモデルでの検討や組織破壊の指標となるカリウムの上昇をきたした動物では、HbVによる蘇生では微小循環の回復は他の蘇生液と同等の効果を呈し、絞扼性障害に陥った虚血再灌流障害を改善できる可能性が示唆された。また、② 尾動脈より出血を持続し、出血性ショックとしたラットモデルにおける検討においてHbVの急速輸液、大量輸液が、輸血や他の膠質蘇生液と同等の蘇生効果を有し、大量、急速投与に伴う循環動態の異変は認められなかった。③ HbV

をラットに投与すると、一過性の免疫抑制を引き起こすことが解っているため、免疫抑制の担当細胞を同定することを目的にラット脾細胞を用いて検討した。HbVは濃度依存性に脾細胞の増殖を抑制し、HbVを貪食するCD11b/c, class IIのImmature monocyteであることと、T細胞の増殖抑制にはiNOSのみではなく、Arginaseも関与していることが確かめられた。④ HbVの代謝は主として肝臓で行われるので、肝代謝の変動によりHbVの体内動態は変動することが予想される。重症の患者では肝機能が低下していることが多く、肝機能低下時のHbVの代謝変動を解析する必要があると考えられる。そこで、四塩化炭素誘発ラット慢性肝障害モデルを用いてHbVの代謝をトリチウム標識した<sup>3</sup>H-HbVを用いて検討した。HbVのクリアランスは著しい個体差があり、この差は肝障害の程度と負の相関を示した。肝障害の指標としてAST(アスパラギン酸アミノ基転移酵素)の値と負の相関関係を持ち、HbVの代謝を予測する指標として有効と考えられた。⑤ HbVは、粒径が小さく、虚血部位への酸素運搬が可能と考えられる。そこで、皮弁内の虚血部位への酸素運搬についてp50が9mmHgと通常より低い(酸素を離しにくい)HbVを投与したところ、酸素分圧の上昇、新生血管の増加などによる創傷治癒の促進が認められた。⑥ 豚は肺の血管内にレジデントマクロファージが存在し、リポソーム製剤で補体の活性化による疑似アレルギー反応がおりやすい。そこで、HbVと同じ脂質2重膜を持つ空小胞体を投与したところ、従来の脂質で作られた小胞体と比較して疑似アレルギー反応が低減された。⑦ 虚血心筋に対し、HbVを虚血直前に投与すると再灌流後に虚血心筋の機能回復効果を示すので、その機序についてアデノシン受容体ブロッカー、Sarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel blocker、PG合成酵素抑制剤を用いて検討した。これらの抑制剤によっても機能回復効果は抑制されず、虚血・再灌流後の心筋組織中のGSSGを低下させ、蛋白質のthiol残基の酸化を抑制した。また、HbV前投与は心筋組織中のNO<sub>2</sub> contentを低下させた。HbVは虚血再灌流で生じるnitroso-redox balanceの破綻を改善して虚血・再灌流傷害に対して保護効果を発揮すると考えられた。製造法、測定法、物性については、⑧臨床検体に予想される分散液中の電解質濃度測定に与える影響について検討し、ドライケミストリー法ではHbVが40%混合された状態でも測定が可能であることが明らかとなった。⑨ HbVの無菌化工程の基本理念について調査研究を行い、脂質の完全無菌化ののち、HbV作成回路の完全滅菌・全自動操作により製剤製造を目指すこととなった。⑩ HbVを水溶性高分子(代用血漿剤)に分散させると凝集する場合がある。その機序を検討した結果、水溶性高分子の排除体積の総和が溶液全体の体積を超える条件においてHbVは溶液から排除されるように凝集を余儀なくされることが分かった。HbVと高分子量の水溶性高分子を大量に血液中に投与すると、HbV同士で凝集塊を作る可能性が示唆された。⑪ HbVをガス透過性のある微小血管(25 μm)内を流動させ、配位子反応を検討したところ、Hbよりも遅く赤血球と同等の速度であった。管内における粒子(分子)の拡散挙動は、Hb分子(6 nm)では側方拡散が速く、流体の攪拌が促進されるが、粒子径の大きいHbVでは拡散は遅く、これが配位子反応に影響していると考えられた。⑫ 試料製造については、本年度はスケールを大きくし、OOLを製造したが、メト化率、漏出Hbの除去の点で改良が必要であった。また、⑬無菌化工程では圧力による無菌化は理論上および実験場は可能と考えられたが、現実には採用するには規模が大きくなり、全工程を無菌化・自動化する方法が実現性が高いことが

明らかとなった。

## 研究分担者

小林 紘一 慶應義塾大学医学部外科名誉教授  
池田 久實 北海道赤十字血液センター 所長  
小田切優樹 熊本大学大学院医学薬学研究部  
客員教授／崇城大学薬学部 教授  
高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長  
川崎医大 名誉教授  
土田 英俊 早稲田大学理工学研究所名誉教授  
顧問研究員  
酒井 宏水 早稲田大学理工学研究所 准教授  
高野 久輝 ニプロ(株) 人工臓器開発センター  
センター長  
甲斐 俊哉 ニプロ(株) 医薬品研究所 所長  
大鈴 文孝 防衛医科大学校 教授

### A. 研究目的

われわれが開発研究を進めているヘモグロビン小胞体(以下HbVと記す)は期限切れとなった献血血液よりヘモグロビンを高度に分離精製、濃縮し、脂質2重膜で被覆したリポソーム製剤である。本研究ではHbVを臨床応用するために現在まで行ってきた検討結果を踏まえ、投与の至的条件を検討し、GMP製造技術を確認することを目的としている。

HbVはリポソーム製剤であり、通常のリポソーム製剤と異なる膜組成により、血球成分との相互作用を極小化するように設計されている。大量のHbVを急速に輸液しても、輸血に劣らない蘇生効果と安全性が認められるかについて検討する必要がある。また、これらの検討を通して、輸注量及び輸注スピードに制限を設けるべきかについては臨床応用以前に検討をすべきである。

#### 【動物を用いた至適投与方法について】

人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体(HbV)は小粒径の特徴を生かし、血漿層に分布して血流中を流れ、細動脈、毛細血管では、組

織の酸素加に有利な血管壁直下を流れると考えられている。このため、虚血による組織障害や臓器不全の治療に有効であると期待されている。

今回、われわれは上記項目を検討するため大量出血時のHbVの投与及び挫滅症候群における投与の安全性、HbV投与により免疫抑制状態を起こす細胞の特定、肝代謝異常時のHbVの代謝過程、HbVが混在した臨床検体の電解質濃度測定法、無菌化工程の基本理念と製剤製造法の検討、膠質浸透圧を有する溶液と同時に投与する際のHbVの凝集についての検討、酸素高親和性HbVを用いた皮弁虚血領域の酸素加と創傷治癒について検討した。

#### 【HbV製剤のGMP製造】

また、HbVの物性解析としてガス透過性のある微小細管を用いて、酸素、一酸化窒素、一酸化炭素のガスの移動について検討し、細動脈領域での酸素運搬についてシュミレーションを行った。また、豚におけるHbVの反応について疑似アレルギー反応が起こるかを検討する。

GMP製造の確立ではGLP試料の質の改善を行い、無菌化工程について検討した。

虚血心筋に対する虚血再灌流後の機能回復効果についてその機序を膜に存在する酵素の面から検討した。

### B. 研究方法

#### 動物を用いた生体適合性及びHbVを用いた治療法適応拡大の検討

##### ①挫滅症候群に対するHb小胞体の効果

Wistar系ラット(雄性、8週齢、374±22g)38匹を用い、右下肢を絞扼後挫滅、脱血を行い出血性ショックとし、40分放置、絞扼解除とともに蘇生を

開始、蘇生液（5%アルブミン生食、HES（Hydroxy ethyl starch）、HbV分散5%アルブミン生食）による蘇生効果について比較検討した。

## ②持続性出血による出血性ショックに対するHb小胞体輸注の有効性の評価

Wistar系ラット(雄性、8週齢、374±22g)34匹を用い、尾動脈より持続的に出血させ、循環血液量の30%の出血が認められた時点で蘇生を開始、生食、5%アルブミン生食、HES、洗浄赤血球、HbV分散5%アルブミン生食)を蘇生液として使用した。生存時間、血圧、出血量、心拍数、ヘマトクリット、血漿乳酸値、pH、について検討した。

## ③Hb小胞体が免疫系に与える影響とその機序の解明

WKAHラットを用い、HbV生食分散液あるいはHbを内包しない空リポソームを推定循環血液量の20%尾静脈より静脈内投与し、対照群には同量の生食を投与、16時間後に脾臓を摘出、脾細胞を分離ConA刺激培養、および小胞体貪食細胞のソーティングを行い、貪食細胞表面のマーカーをFlow cytometryにて検討した。また、L-NMMAのr-NOHAのT-cell増殖抑制に対する関与を検討した。

## ④Hb小胞体の体内動態特性に関する検討

四塩化炭素誘発慢性肝障害ラットにおいてコレステロールをチミジンで標識、肝障害ラットに静脈内投与し、HbVの肝への分布量、血漿内HbV量、採尿、採糞により排泄物中への変化量を測定した。

## ⑤虚血皮弁におけるHb小胞体の治癒促進効果の検討

重篤な虚血領域を有する皮弁をラット背部より作成し、p50 =9TorrのHbVを尾静脈より投与、皮弁内の酸素分圧、6日後の生着率、皮弁内の毛細血管数、血管内皮NO合成酵素の発現量を検討した。

## ⑥Hb小胞体投与による補体活性の増強と疑似アレルギー反応に関する検討

補体活性による循環動態の変動が大きいブタを用いてHbVを同一の脂肪組成からなる小胞体、および補体活性を生起する従来型脂質より構成された小胞体を投与し、循環動態を比較検討した。

## ⑦心筋の虚血再灌流におけるHb小胞体の保護効果

ラット心を摘出し、ランゲンドルフ灌流を行う。虚血直前にHbVの30倍希釈懸濁液を用いて還流し、25分の虚血後再灌流を行った。再還流時にアデノシン受容体ブロッカーのテオフィリン、sarcolemmal KATP channelブロッカーのglimepirid、PG合成酵素抑制材のIndomethacin、NO合成酵素抑制剤のL-NAMEを用いて左室発生圧、心筋組織中のGSH、GSSG含有量組織蛋白のthiol残基の酸化度を測定した。

## GMP製造に関する検討およびHbVの物性に関する検討

## ⑧Hb小胞体混入血液における電解質測定への影響に関する検討

HbVを容量比で40%から1.25%となるようにヒト血液中に混じ、ドライケミストリ-法（ビトロス250）、および、電極法（TBA-200FRNEO）にて測定した。また、空小胞体に生理食塩水を添加してナトリウム、カリウムの測定による変化を明らかとする。

## ⑨Hb小胞体の無菌化工程のシステム構成の検討

共同研究者、研究協力者との会議を催し、無菌化工程につき検討する。

## ⑩Hb小胞体と水溶性高分子（代用血漿剤）との相互作用に関する検討

HbV分散液を超遠心し、沈殿したHbVに膠質浸透圧を有する蘇生液である4%アルブミン生食、4

種のヒドロキシエチルスターチ溶液 (HES 68kDa、130kDa、240kDa、670kDa)、4種のデキストラン溶液 (DEX 分子量42kDa、73kDa、184kDa、595kDa)、修正ゼラチン溶液 (MFG、Gelofusin、30kDa) を混じ、Hb濃度10g/dlに調整した。これら液体の粘度測定と顕微鏡観察を行い、膠質浸透圧の測定、慣性半径、流体力学的半径を測定、算出した。

#### ⑪Hb小胞体内の配位子反応と血管活性の相関

ヘモグロビンの状態としてHb溶液、ウシ重合ヘモグロビン溶液、HbV、ヒト赤血球を用いて25 $\mu$ 系の微小細管中に流し、NO、COガス存在下および窒素雰囲気下での酸素放出挙動を顕微可視吸収スペクトルを測定することによって検討する。

#### ⑫Hb小胞体GLP試料の製造と製法の改良

HbVのGLP試料製造における混合脂質の定量法を再構築し、分析パラメーターを確認した。

#### ⑬Hb小胞体の滅菌工程の検討

HbVの滅菌工程を検討し、高圧による滅菌工程のHbVに与える影響と実現可能性について検討した。血液製剤に用いるBPL ( $\beta$ -プロピオラクトン) を用いてHb溶液における微生物殺滅効果煮て浮いて検討した。

動物を用いる検討では各施設における倫理規定に則し、動物実験委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

#### 動物を用いた生体適合性及びHbVを用いた治療法適応拡大の検討

##### ①控滅症候群に対するHb小胞体の効果

45%出血を伴う控滅症候群ではカリウムイオンの上昇が認められ、組織傷害が起こっていることは明らかとなり、膠質浸透圧を有する輸液蘇生により循環状態の改善、組織の嫌気解糖の抑制が得

られた。HbVの改善効果は他の膠質浸透圧を有する蘇生液と同等であった。

##### ②持続性出血による出血性ショックに対するHb小胞体輸注の有効性

非蘇生群、HES蘇生群では4時間以内にすべての動物が死亡したが、HbV投与群では4時間後までの死亡は少なかった。また、HbV投与群では出血量の総量が有意に減少していた。HbV分散液は持続する出血に伴う出血性ショックの蘇生液として使用できる可能性が示唆された。

##### ③Hb小胞体が免疫系に与える影響とその機序の解明

HbVを貪食した脾細胞はマウス脾細胞のConA刺激による増殖を濃度依存性に抑制した。HbVを貪食した細胞を除去した脾細胞集団ではこの抑制は認められなかった。HbVを貪食する細胞はCD11b/c、ClassII-のImmature monocyteであり、T細胞の増殖抑制にはiNOSのみでなくArginaseも関与していた。

##### ④Hb小胞体の体内動態特性に関する検討

四塩化炭素誘発慢性肝障害ラットにおいてはHbVの血中クリアランスは低下した。この低下は血清中AST値と負の相関が認められた。肝障害ラットにおいても投与14日後には血中、臓器中にも放射活性は認められず、慢性肝障害においてもHbVは十分排泄されると考えられた。

##### ⑤虚血皮弁におけるHb小胞体の治癒促進効果の検討

重篤な虚血領域を有するラット皮弁においてp50=9TorrのHbVは、皮弁内の酸素分圧を上昇させ、6日後の生着率の向上、皮弁内の毛細血管数の増加、血管内皮NO合成酵素の発現量の増大が認められた。

##### ⑥Hb小胞体投与による補体活性の増強と疑似アレ



## ルギー反応に関する検討

従来型脂質を有する小胞体では一過性の血圧、肺動脈圧、血管抵抗の上昇、除脈、心拍出量の低下、血小板数と白血球数の低下TXB2の顕著な上昇を認めたと、DHSG系の小胞体ではこれらの反応が顕著に抑制された。

## ⑦心筋の虚血再灌流におけるHb小胞体の保護効果

ラット心の虚血再灌流モデルにおいてHbVによる心機能回復効果はL-NAMEによる効果と類似しており、虚血再灌流後のGSSGを低下させ、蛋白のthiol残基の酸化を抑制した。また、心筋組織中のNO<sub>2</sub>濃度を低下させた。

## GMP製造に関する検討およびHbVの物性に関する検討

## ⑧Hb小胞体混入血液における電解質測定への影響に関する検討

電解質測定においてドライケミストリ法ではHbVが分散して浮遊する状態でも測定が可能であったが、電極法ではHbVの混入率が一定以下でないと測定できなかつた。リポソームそのものが測定に干渉している可能性が示唆された。

## ⑨Hb小胞体の無菌化工程のシステム構成の検討

共同研究者、研究協力者との会議を催し、無菌化工程につき検討し、滅菌工程を確立する検討とともに全製造ラインを滅菌して全自動操作とすることにより製剤を製造する方法を検討することとなった。

## ⑩Hb小胞体と水溶性高分子（代用血漿剤）との相互作用に関する検討

ヒドロキシエチルスターチ、デキストラン溶液ではHES、DEXの分子量が大きくなって流体力学半径、慣性半径が大きくなるに従ってHbVの凝集の程度が増大し、粘度が増したが、HESとDEXでは大き

な隔たりを認めた。水溶性高分子の排除体積の総和が溶液全体の体積を超える条件ではHbVは溶液から排除されるようにして凝集を余儀なくされる様相が明らかとなった。

## ⑪Hb小胞体内の配位子反応と血管活性の相関

ヘモグロビンが分子として存在するHb溶液、ウシ重合ヘモグロビン溶液では粒子として存在するHbV、ヒト赤血球に比してNO、COガスを速くガスを結合し、また、速い酸素放出を示した。血流中での粒子の拡散挙動をシュミレーションしたところ、分子状のHb溶液では側方拡散が速く、側方拡散の違いが血管反応性を強調している可能性が示唆された。

## ⑫Hb小胞体GLP試料の製造と製法の改良

HbVのGLP試料製造における混合脂質の定量をHb存在下で行う方法を再構築し、リポソームの可溶化と溶媒添加による脂質溶解と蛋白除去を行うサンプル調整によって高精度で脂質4成分の定量が可能となった。

## ⑬Hb小胞体の滅菌工程の検討

HbVの滅菌工程を検討し、高圧による滅菌工程のHbVに与える影響と実現可能性について検討したが、ヘモグロビンの変性が問題となることが明らかとなった。血液製剤内の最近の殺滅処理に用いるBPLを用いた検討ではHb溶液での検討では効果があった。

## C. 考察

以上の検討を行い動物を用いた検討では

組織控滅が加わる状況であってもHbVは急性期には安全に投与でき、持続出血に用いて、生存時間の延長、臓器での好気代謝の維持が可能で、循環血液量を超える投与も可能であることが示され、救急領域で輸血と同等の自由度を持って使用できる可能性が示された。

免疫抑制状態を惹起する細胞集団が明らかとなり、この免疫抑制状況が病的状態を形成するかについて今後検討が必要と考えられた。

肺胞血管内にマクロファージを保有する豚においてHbV型の小胞体による血圧、肺動脈圧への影響が従来型の小胞体に比して抑制されていることより、小胞体型の薬剤の新たな開発にもつなげる結果と考えられた。

虚血再還流時の心筋保護効果、重症虚血皮弁の治癒促進効果が明らかとなり、酸素供給効果以外にHbVが果たす役割が明らかになり、薬剤としての使用法を検討すべきと考えられた。

物性、検査法および製造法の検討では

簡便な臨床検査法のうち、電解質測定が日常使用しているドライケミストリー法で測定できることが示され、臨床応用において重要な成果と考えられた。

HbVの配位子反応の解析からHbVが分子でなく微小粒子であるためにガス拡散、ガス捕捉・放出において血管反応性を惹起しないことが明らかとなり、開発の方向性の正しさを明らかとした。また、代用血漿剤によっては微弱な相互作用によりHbVを凝集させることの機序が明らかになった。

GLP試料製造では研究者が必要とする試料を調整できたが、精度管理についてより厳重に取り組むことが必要と考えられた。GMP製造については各工程について実現可能性を検証することが必要であると考えられた。

#### D. 結論

動物を用いたHbVの生体適合性試験では救急領域での使用で避けて通れない急速輸液、大量投与の安全性について血液と遜色のない成果を得られ、さらに大型の動物での検討が必要と考えられた。

また、HbV投与後に認められる免疫抑制状態については一過性なものであると報告されているが、さらに検討を進める必要がある。肝代謝異常においてはHbVの血中及び臓器中のクリアランスは低下するが長期的にはすべてが排泄されることが明らかとなり、肝機能低下例にも安全に投与できる道が開かれた意義は大きい。代謝物は尿と分に排泄されることが明らかとなっているので、腎代謝および消化管障害時の代謝についての検討が今後必要である。虚血再灌流障害からの心機能回復効果、および虚血皮弁での生着促進効果には酸素供給と同時にNOの関与があることが示唆され、HbVの新たな薬理効果として検討の価値がある。

物性の検討では、電解質測定で日常臨床で使用されているドライケミストリー法で測定できることが明らかとなり、臨床検査法の制約を解消した結果として重要である。

また、人工酸素運搬体の開発の進捗を阻んできた血管反応性が分子状の構造にあることが推察され、HbVの開発方針を補強するものである。水溶性高分子溶液とHbVの相互作用は製剤化する際の重要な基礎情報と考えられた。

GLP試料製造には十分な精度管理が必要であることが明らかとなった。

GMP製造法の検討ではほとんどの工程でGMP化が可能であるが、最終滅菌工程に関しては実現可能性も考慮に入れた検討が必要である。

## 分担課題：挫滅症候群に対するHb小胞体の効果についての検討

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

## 研究要旨

挫滅症候群(Crush syndrome) は外傷とともに四肢筋への圧迫が加わり、循環障害が起こって、圧迫解除後に圧迫壊死を起こした組織よりの細胞内液やミオグロビンなどの細胞内蛋白・電解質が血中に流入し、ショック・多臓器不全を起こす。出血を伴うと輸血の頻度が高く、輸血によりサイトカイン血症による症状を増悪させることも報告されている。輸血に変わり、Hb小胞体を投与することにより、酸素運搬を効率よく行いつつサイトカインの増加を抑制することができるかについて検討した。ラット右後肢を基部で絞扼し、循環を低下させた状態で200gの重りを1mの高さより落下させ、腓腹筋、大腿屈筋を挫滅・受傷させる。受傷と同時に大腿動脈より循環血液量の45%を脱血し、右大腿を絞扼したまま40分ショック状態のまま放置したのち、絞扼を解除すると同時に蘇生液で蘇生を行う。蘇生液としてHES,アルブミン生食、血液、HbV分散液とした。HbV分散液で蘇生を行った群ではショックよりの回復は良好で、循環諸標とともに右後肢足背の皮下血流は早期に血流が回復した。HbVは絞扼性障害に陥った部位の虚血再灌流障害を改善できる可能性が示された。

## A. 研究目的

人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体(HbV)は小粒径の特徴を生かし、血漿層に分布して血流中を流れ、細動脈、毛細血管では、組織の酸素加に有利な血管壁直下を流れると考えられている。このため、虚血による組織障害や臓器不全の治療に有効であると期待されている。

今回、われわれは外傷により出血、同時に組織圧迫が起こるために、組織・細胞が崩壊、細胞内液やたんぱく質などが血管内に漏出し、サイトカインの産生の増加とともに組織障害が増強する挫滅症候群に対し、HbVによる蘇生がどの程度有効であるかを検討するために動物モデルを用いて検

討した。

## B. 研究方法

Wistar ラット(雄性、8週齢、 $374 \pm 22$ g) 38匹を使用、セボフルレン2.0%にて自発呼吸下吸入全身麻酔を行い、右頸動脈に血圧測定用ライン(SP45)右頸静脈に輸液用のライン(SP45)を、左鼠径部に脱血用ラインを(SP31)留置した。右後肢中足の背側にドップラー血流計を装着し、皮膚血流を測定した。腹部皮下に針状の酸素電極を刺入(不関電極は鼠径部を切開し、皮下に設置)し、皮下酸素分圧を測定した。四肢に心電図電極を装着した。これらの計測機器はポリグラフ PEG1000(日本光電)につ

なぎ、連続記録するとともに状態を監視した。なお、尿量は自然排尿分を回収し、測定することとした。

絞扼と脱血は監視装置の設置が終了し、10分以上経過して状態が安定したのちに開始した。まず、右鼠径部に結束バンドをまき、中足の皮下血流が消失するまで絞扼する。皮下血流の消失はレーザードプラー血流計が0.4 ml/min/100gtissue)以下となるのを確認した。筋肉の挫滅は絞扼直後に行い、600gの真鍮製の重りを右後肢腓腹筋及び大腿屈筋に向けて落下させ受傷させた。絞扼が解除されたり、骨折した際には検討から除外した。挫滅直後より左大腿動脈より脱血を行った。脱血量は循環血液量の45%、脱血スピードは180 ml/kg/hr (350gのラットで1.05ml/min)とし、シリンジポンプで脱血の量とスピードを調節した。経路として腹側正中尾動脈に24Gサーフロー留置心を挿入留置、SP45カテーテルを接続する。輸液経路として背側中足皮静脈に24Gサーフロー針を留置、SP45カテーテルを接続、動脈圧測定のために右動脈にSP45カテーテルを挿入、留置、採血経路として左大腿動脈にSP31カテーテルを挿入した。ECG、MAPをポリグラフPEG1000(日本光電)にて連続記録し、呼吸数は目視により経時的に計測した。

カテーテルを留置し、動物の状態が安定したのち、絞扼、血流の途絶を確認、脱血、引き続き絞扼を30分間行い絞扼を解除した。

絞扼を解除終了後より輸液蘇生を開始、輸液量は脱血量と同僚、輸液速度は脱血速度と同等とし、輸液終了後はそのまま経過を観察した。

心拍数、血圧、組織酸素分圧、右中足背部皮下血流は連続記録した。これに呼吸数を加え、実験開始時、絞扼開始時、脱血終了時、絞扼解除直前、直後、輸液終了直後、その後は30分ごとに絞扼解除後3時間まで経時的に測定し、記録した。

また、実験開始時、絞扼解除直後、輸液終了直後、実験終了時に採血を行い、末梢血液検査、血液ガス分析、血糖値、乳酸濃度、カルシウムイオ

ン、カリウムイオン、重炭酸イオン濃度、ヘマトクリットを測定した。

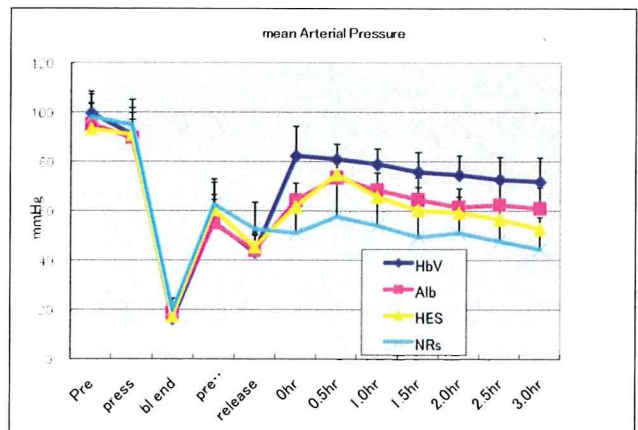
倫理的配慮：実験プロトコールは慶應義塾大学医学部実験動物センターおよび動物実験委員会の承認を得て行なわれ、実験動物に関しては、十分な麻酔下にて実験を試行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

## C. 結果および考察

### 1. 血圧の変化及び生存について

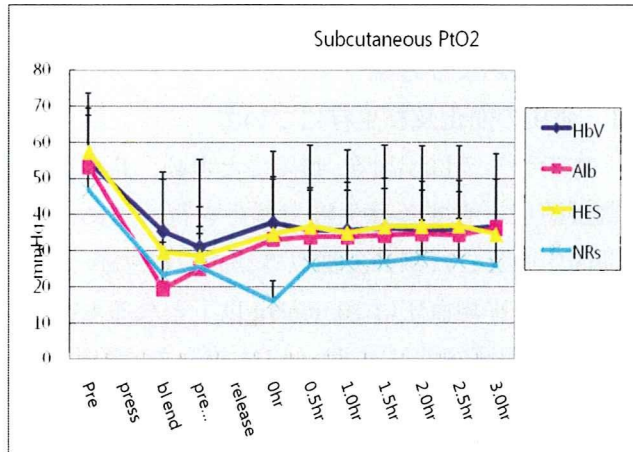
本モデルでは出血を45%にとどめ、止血後に膠質浸透圧を有する蘇生液で蘇生を行うため、実験期間中の死亡は無蘇生群以外認められなかった。

脱血後平均血圧は20 mmHg以下となるも徐々に回復、絞扼解除前には60 mmHg前後まで開腹した。絞扼を解除すると、虚血部位に血流が回復するためか血圧は有意に低下する。無蘇生群では低下したまま回復を見せずに実験終了まで50 mmHgから40 mmHgで経過した。アルブミン生食群、HES群は蘇生後血圧は回復し、アルブミン生食群で73±6.1 mmHg、HES群で74.8±5.1 mmHgまで回復し、その後時間の経過とともに徐々に低下して3時間後には60.9±8.3 mmHg、52.7±4.8 mmHgとなった。HbV群では蘇生後82.3±12.0 mmHgまで上昇、その後緩やかに低下し、3時間後には71.7±9.7 mmHgとなった。蘇生後維持輸液を行わなかったことおよび組織の挫滅による影響のため、血圧が徐々に低下することになったと考えられた。



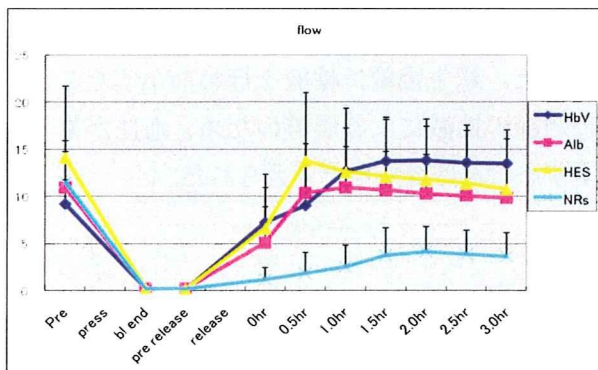
## 2. 皮下組織酸素分圧

皮下組織酸素分圧は出血性ショックにより低下したが、無蘇生群以外は33.1~36.6 mmHgと安定した経過であった。無蘇生群では有意差はないものの、絞扼解除後も低下し、低い値(16.0~28.0 mmHg)で経過した。ショック後の循環不全のため、嫌気代謝の原因となったと考えられた。



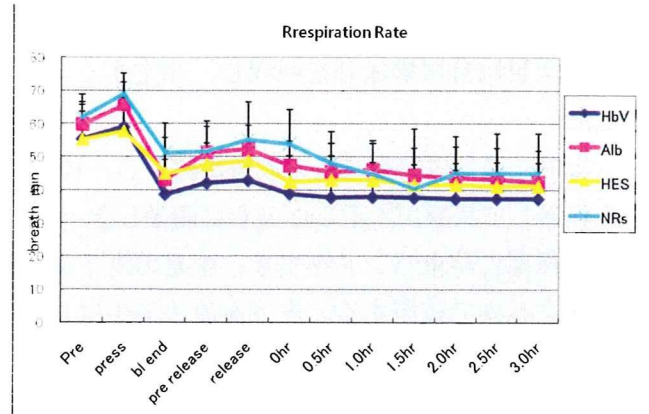
## 3. 右下肢中足背部皮下血流

レーザー Doppler 血流計による絞扼肢皮下血流は絞扼解除とともに緩徐に回復し、1時間後には前値に回復し、観察期間中低下はなかった。無蘇生群では循環血液量の減少、血圧の低下から皮下血流は有意に低下した。



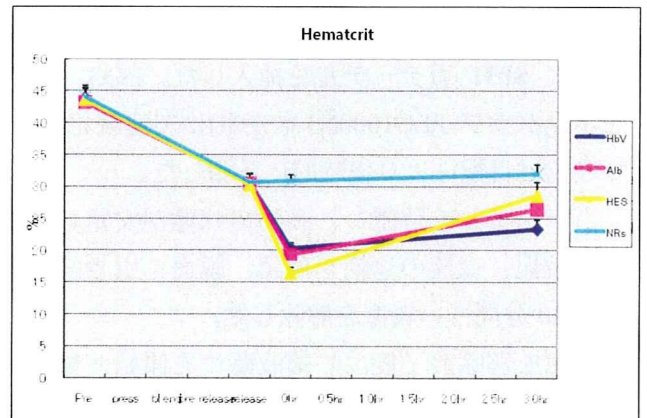
## 4. 呼吸数

呼吸数は全ての群でショックに伴い低下したが、その後は大きな変化なく経過した。呼吸器系には大きな影響を与えていない可能性が示唆された。



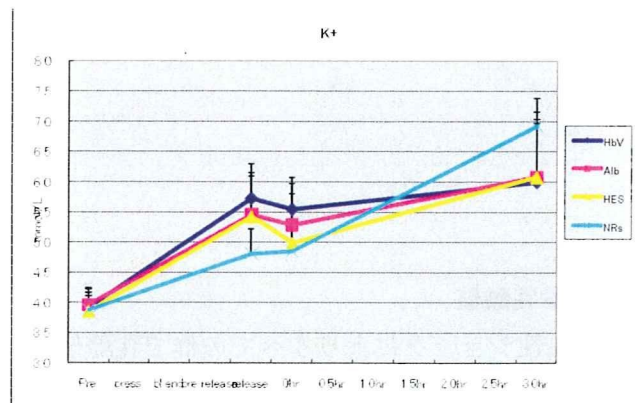
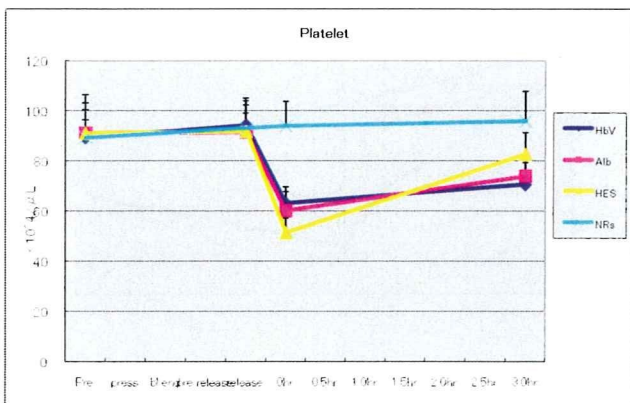
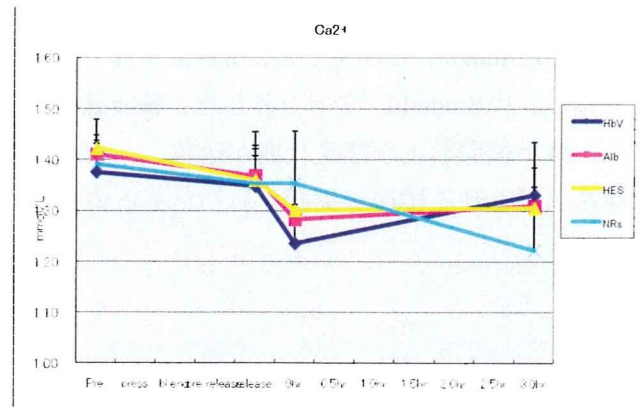
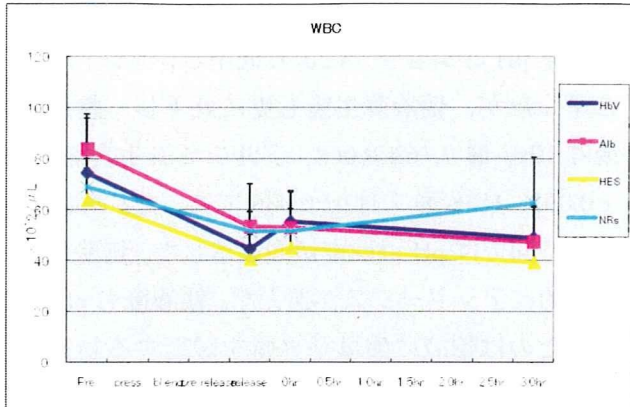
## 5. ヘマトクリット

出血とその後の絞扼により、ヘマトクリットは無蘇生群以外は蘇生に伴いヘマトクリットは30%に低下した。無蘇生群を除いて蘇生後ヘマトクリットは16.3%~20.3%に低下し、実験終了時にはHbV群23.3±1.5%、アルブミン生食群26.4±1.9%、HES群28.5±2.2%であった。ヘマトクリットの上昇は血漿成分の血管外漏出が原因と考えられ、HbVをアルブミン生食に分散した溶液は血管の透過性保持の点で優れていると考えられた。



## 6. 白血球数、血小板数

心筋梗塞では白血球数は早期診断の重要な指標となるが、本モデルでは脱血により減少した白血球数は蘇生後上昇が抑制された。血小板数は絞扼解除・蘇生後急激に低下したが、その後は徐々に増加した。絞扼解除により虚血部位の血管内皮の傷害が血小板を活性化して血管内で粘着、消費されたためと考えられた。



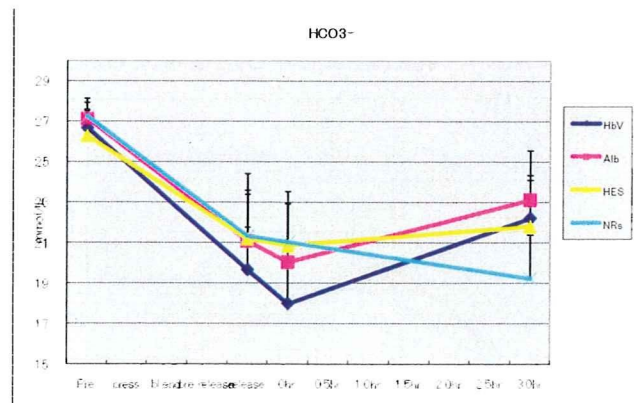
## 7. 電解質

挫滅症候群では挫滅部位の細胞・組織の崩壊により細胞質内容の血管内流出により電解質異常が認められることが報告されている。電解質としてカルシウムイオン、カリウムイオン、重炭酸イオンを測定した。

カルシウムイオンは蘇生液の投与によって低下し、蘇生終了3時間後には回復を示した。これは、カルシウムイオンを含まない輸液により血漿カルシウムイオンが希釈された後、体内プールから補充された結果であると考えられた。

一方カリウムイオンは絞扼解除により一気に上昇し、輸液により若干希釈されるもののその後も上昇し、蘇生終了後3時間ではすべての群で危機的なレベルである6 mEq/Lを超えた。この上昇は挫滅した細胞より漏出した結果と考えられる。

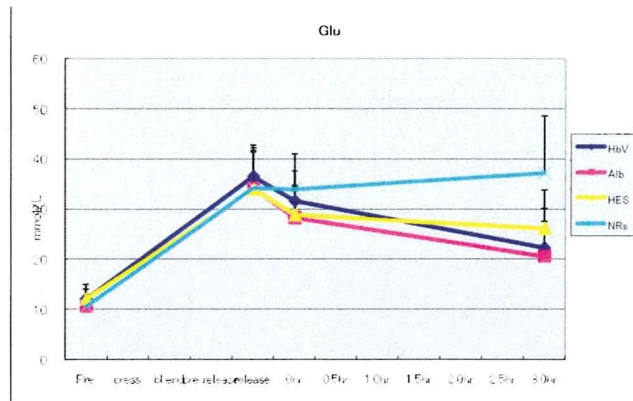
重炭酸イオンは出血性ショック後に著しく低下し、輸液により更に希釈されたが、輸液終了3時間後にはすべての群で上昇を認めた。ショック後の減少は輸液による希釈と考えられ、その後の蘇生群における上昇は組織の酸素代謝が回復していることを示唆するものと考えられた。



## 8. グルコース

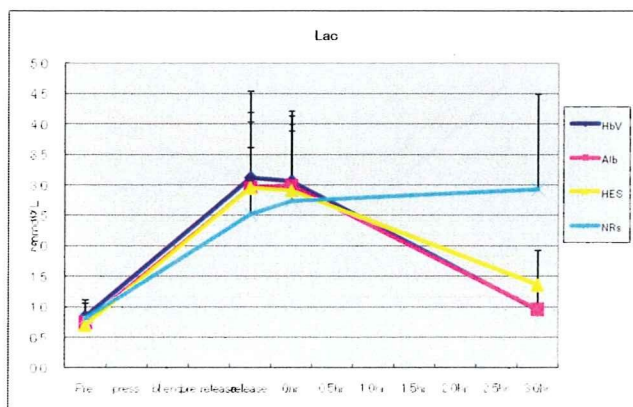
血漿中のグルコースは出血性ショック後に著しく上昇した。蘇生群では輸液とともに低下し、輸

液終了 3 時間後には正常値の 2 倍程度である 20.6~26.2 mmol/L に回復したが、無蘇生群では更に上昇し、37.3mmol/L まで上昇した。輸液蘇生により、微小循環および酸素代謝が改善し、また、血糖を上昇させる機序が抑制されたためと考えられた。



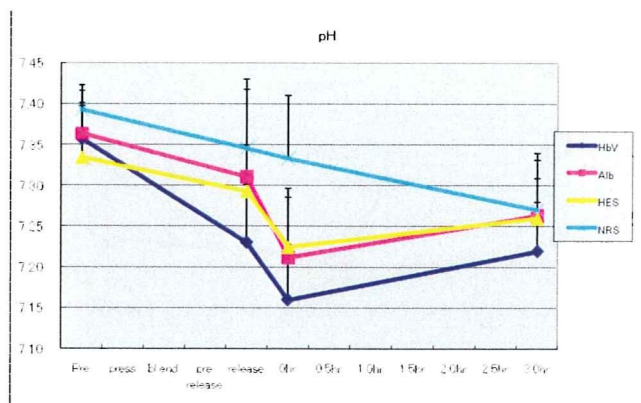
### 9. 血漿乳酸値

出血性ショックによりすべての群で乳酸値は上昇、輸液蘇生によっても希釈されず、高値が保たれた。輸液終了 3 時間後には輸液蘇生を行った群では一様に低下し、HbV 群を除いてほぼ正常値に回復した。無蘇生群では絞扼解除後も上昇し、最終的には正常値の 3 倍である  $2.9 \pm 1.6$  mmol/L まで上昇した。輸液蘇生により、嫌気解糖が抑制され、正常な酸素代謝が回復したためと考えられた。無蘇生群では嫌気解糖が抑制されず、組織循環も改善しないため、乳酸値は上昇したと考えられた。



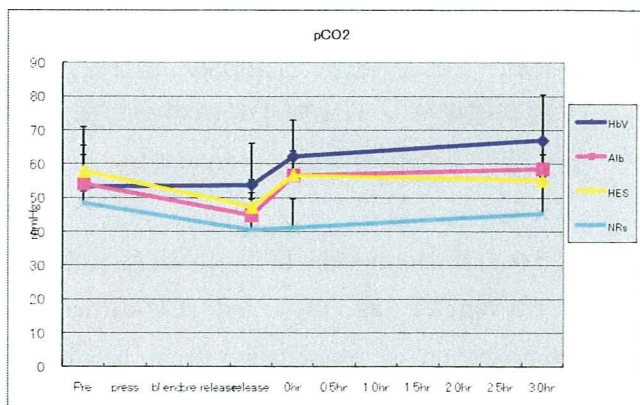
### 10. pH

血漿 pH はショックにより低下し、アシドーシスを呈したが、輸液蘇生後も更に低下し、輸液終了後は HbV 群  $7.16 \pm 0.068$ 、アルブミン生食群  $7.224 \pm 0.061$ 、HES 群  $7.212 \pm 0.085$  であった。輸液終了後 3 時間では pH は回復傾向を示した。無蘇生群は持続的にアシドーシスが進んだ。輸液後も pH が低下したのは輸液に酸塩基平衡を緩衝する物質が含まれていなかったためと考えられた。



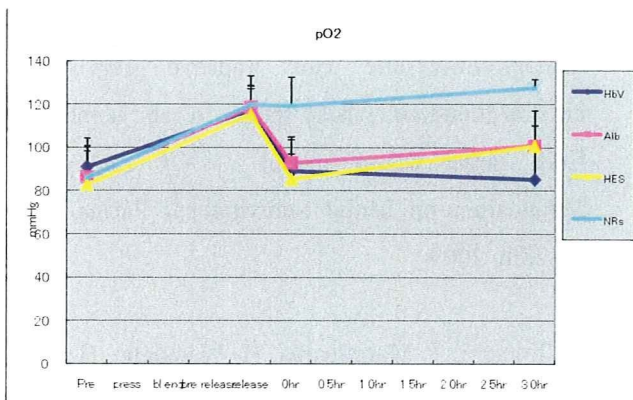
### 11. pCO<sub>2</sub>

ショック後呼吸数は上昇、pCO<sub>2</sub> は減少した。これは換気の増加によるものと考えられた。輸液終了後呼吸数は徐々に減少、pCO<sub>2</sub> は輸液終了後に上昇し、HbV 群では  $67 \pm 13.5$  mmHg、アルブミン生食群では  $58.6 \pm 8.9$  mmHg、HES 群で  $55.1 \pm 7.6$  mmHg であった。HbV 群では pCO<sub>2</sub> が有意差はないものの他の蘇生群と比し高い傾向にあった。本研究で使用したモデルでは呼吸状態に与える影響が少なく、血液の酸素運搬能も十分にあったためと考えられる。



## 12. pO<sub>2</sub>

pO<sub>2</sub>はショック後上昇し、輸液により低下した。蘇生後の変化はアルブミン生食群、HES群がそれぞれ  $100.9 \pm 9.3 \text{ mmHg}$ 、 $100.8 \pm 16.5 \text{ mmHg}$  とわずかに上昇したが、HbV群では  $85.4 \pm 15.7 \text{ mmHg}$  と減少を認めた。これは血漿中に挫滅組織から出る物質によりHbが早期にメト化した可能性が上げられる。



## D. 結論

45%出血を伴う挫滅症候群ではカリウムイオンの上昇が認められ、組織傷害が起こっていることは明らかとなったが、膠質浸透圧を有する輸液蘇生により循環状態の改善、組織の嫌気解糖の抑制が得られた。HbVの明らかな改善効果は得られなかった。

## E. 健康危険情報

該当なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. *Shock* 31, 507-514 (2009).
- K. Taguchi, T. Maruyama, Y. Iwao, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J. Control. Release* 136, 232-239 (2009)
- K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, T. Maruyama, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1456-1463 (2009)
- H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Histopathological changes of rat brain after direct injection of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. *J. Biomed. Mater. Res.* 90A, 1107-1119 (2009).
- K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, H. Watanabe, D. Kadowaki, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, T. Maruyama, M. Otagiri. Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG)ylated liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce the accelerated blood clearance



- phenomenon in mice. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2197-2203 (2009).
6. 堀之内宏久、小林紘一、酒井宏水、土田英俊. 人工酸素運搬体. 「からだと酸素の事典」酸素ダイナミクス研究会 編. 第5章:酸素の利用. pp.478-484, 2009, 朝倉書店, 東京.
  7. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier, that fulfils the physiological roles of the red blood cells structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 662 (Oxygen Transport to Tissue XXXI) 433-438 (2010).
  8. Kuroda H, Mochizuki S, Shimoda M, Chijiwa M, Kamiya K, Izumi Y, Watanabe M, Horinouchi H, Kawamura M, Kobayashi K, Okada Y. ADAM28 is a serological and histochemical marker for non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer*. (2010) in press.
  9. 池田達彦, 堀之内宏久, 森岡秀夫, 矢部啓夫, 林雄一郎, 小林紘一. 胸骨の一部を含む胸壁全層切除を行いtitanium reconstruction plateによる再建を行った2例. *日本呼吸器外科学会雑誌* 23(6), 861-865 (2009)
  10. 堀之内宏久【耳鼻咽喉科の外傷に強くなる】気管損傷 呼吸器外科の立場から. *JOHNS* 25(9), 1399-1402 (2009)
  11. 黒田浩章, 川村雅文, 泉陽太郎, 堀之内宏久, 松村紳一郎, 堀口速史. オクトレオチドが著効した放射線が原因と考えられた遅発性難治性乳糜胸の一例. *日本呼吸器外科学会雑誌* 23(5)号 772-776 (2009)
2. 学会発表
    1. 小林紘一、堀之内宏久、土田英俊、酒井宏水 / 人工酸素運搬体 / 日本医工学治療学会第25回学術大会 / 大阪国際会議場 / 2009.4.10
    2. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Hb-vesicles as O<sub>2</sub>- and CO-carriers for cytoprotection at resuscitation from hemorrhagic shock / 55th- ASAIO-IFAO conference / Dallas / 2009. 5.28-30
    3. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physicochemical characteristics of Hb-Vesicles as RBC substitutes / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
    4. H. Horinouchi, Y. Seishi, K. Kobayashi, Y. Izumi, M. Kohno, H. Sakai, E. Tsuchida. / Resuscitation with hemoglobin-vesicle can improve survival in uncontrolled hemorrhage model in rats: hemorrhage from large vessel model / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
    5. K. Taguchi, T. Maruyama, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, M. Otagiri / Pharmacokinetic profiles of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
    6. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Effect of large volume resuscitation with the cellular type artificial oxygen carrier (Hb-vesicle) in rat model of uncontrolled hemorrhagic shock via a caudial artery. / XII International Symposium on Blood Substitutes /

Parma / Aug 25-28th, 2009

7. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Effect of large volume resuscitation with the cellular type artificial oxygen carrier (Hb-vesicle) in rat uncontrolled hemorrhagic shock model caused by blunt kidney injury. / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
  8. 酒井宏水、岡本紀子、池田栄二、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊/ 脳内出血モデルによるHb小胞体の脳神経組織への影響に関する検討 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
  9. 田口和明、渡邊博志、門脇大介、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 / 出血性ショックモデルラットにおけるヘモグロビン小胞体頻回投与時の体内動態解析 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
  10. 勢司泰久、堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊、小林紘一 / 制御不能尾動脈出血モデルを用いたヘモグロビン小胞体輸液蘇生の検討 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会/ 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
  11. 堀之内宏久、泉陽太郎、酒井宏水、小松晃之、土田英俊、小林紘一 / 実験腫瘍における腫瘍酸素分圧のマッピングと人工酸素運搬体投与による腫瘍の酸素加 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
  12. 宮里麻友美、田口和明、渡邊博志、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 / 四塩化炭素誘発肝障害モデルラットにおけるヘモグロビン小胞体の体内動態の検討 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
  13. 藤原満博、東寛、若本志乃舞、泉陽太郎、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、武田純三、池田久實 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
  14. H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, k. Kobayashi. / Research and development of hemoglobin vesicle, a cellular type artificial oxygen carrier / 20th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Asia / 名古屋国際会議場 / 2009. 11. 14-18.
- G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）  
該当なし

## 分担研究報告書

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定とGMP製造技術の確立

分担課題：持続出血による出血性ショックに対するHb小胞体輸注の有効性についての検討

研究分担者 小林 紘一 慶應義塾大学医学部 外科 名誉教授  
研究協力者 勢司 泰久 慶應義塾大学 総合医科学研究センター 助教

## 研究要旨

輸血の代用として開発されたHb小胞体は、血液型がなく、ウィルスなどの感染源を排除、室温で2年以上の備蓄が可能であり、出血性ショック蘇生液としての効果と安全性が動物実験において実証されている。臨床応用を視野に入れ、ビーグル犬を用いての交換輸血後の長期生存試験などが進行している。しかしながら出血がコントロールできない状況での蘇生法についてはまだ標準治療がなく、臨床現場での対応に任されているのが実情である。持続出血による出血性ショックに対して急速大量輸液による蘇生法の適応を明らかとするとともに、Hb小胞体の効果を検討した。ラット尾動脈より持続的に出血させ、出血性ショックを持続するラットモデルを作成し、出血後ショック状態となつてから生食、HES(ヒドロキシエチルスターチ)溶液、Hb小胞体分散液を用いて蘇生を行う群を設定し、非蘇生群も含め、蘇生効果および生存率を評価した。その結果、非蘇生群、HES蘇生群では4時間以内にすべての動物が死亡したが、Hb小胞体投与群では4時間後までの死亡は少なかった。また、Hb小胞体群では出血量の総量が有意に減少していた。Hb小胞体分散液は持続する出血に伴う出血性ショックの蘇生液として使用できる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体(HbV)の生体への急速かつ大量投与が安全に行えれば、外傷性失血の現場でも使用できることが期待される。ラットを用い、尾動脈出血モデルを用いて出血性ショック蘇生モデルを作成し、HbVの大量かつ急速輸液による安全性及び蘇生効果を血液、アルブミン生食、HES溶液と比較することを目的とした。

## B. 研究方法

Wistar ラット(雄性、8週齢、358±25g) 34匹を使用、セボフルレン2.0%にて自発呼吸下吸入全身

麻酔を行い、脱血経路として腹側正中尾動脈に24Gサーフロー留置心を挿入留置、SP45カテーテルを接続する。輸液経路として背側中足皮静脈に24Gサーフロー針を留置、SP45カテーテルを接続、動脈圧測定のために右動脈にSP45カテーテルを挿入、留置、採血経路として左大腿動脈にSP31カテーテルを挿入した。ECG、MAPをポリグラフPEG1000(日本光電)にて連続記録し、呼吸数は目視により経時的に計測した。

カテーテルを留置し、動物の状態が安定したのち、尾動脈に留置したカテーテルを開放し、出血を起こさせる。出血が推定循環血液量(BW(g)×5.6%(ml))の30%に達した時点より蘇生を開始し

た。この際、尾動脈よりの出血はこのまま持続させ何ら手を加えることはしなかった。尾動脈よりの出血はコニカルチューブに収集し、その量を測定した。

蘇生液は生理食塩水、6% HES 溶液(分子量 70000、サリンヘス、Fresenius Japan)、5% アルブミン生食(ヒトリコンビナントアルブミン 25% を生理食塩水で希釈し、5% 溶液として使用)、洗浄赤血球(ドナラットよりヘパリン採血し、低速遠心機(2000 回転 15 分)で血漿を分離後、HES 溶液に分散し採血時の容積とした。)を用いた。生食群 7 匹、HES 群 9 匹、アルブミン生食群 7 匹、洗浄赤血球群 6 匹、HbV 群 6 匹で検討を行った。

輸液速度は 56ml/kg/hr とした。これは 60Kg のヒトに換算すると 3.36L/hr の輸液スピードとなり、急速輸液の範疇にはいるが、出血性ショックの症例で治療の際に用いられる量としては妥当なものと思われる。輸液量は循環血液量の 200% としたが、これは実測の出血量の  $105.6 \pm 41\%$  (72.6% ~ 210%) であった。

輸液開始より死亡あるいは 120 分後まで観察を行い、出血前、輸液量が推定循環血液量の 50%、100%、150%、200% になった時点で採血を行い、ヘマトクリット(Ht)、血清乳酸、血清 pH 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。

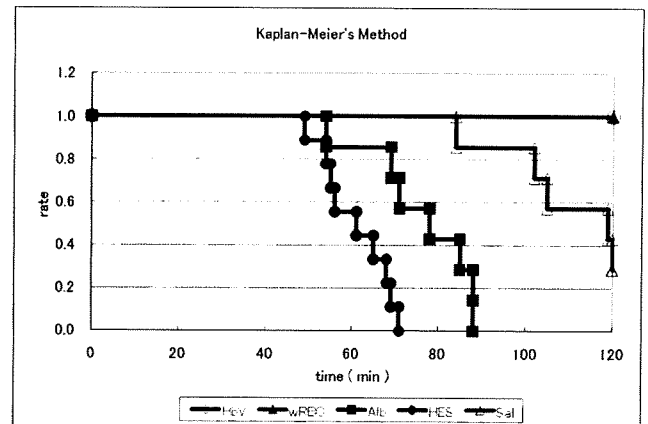
## C. 結果および考察

### 1. 血圧の変化及び生存について

出血は尾動脈より動脈性に出血するため、循環血液量の 30% が出血するのにかかる時間は 2~5 分程度であり、15 分以上かかった動物は検討対象から除外した。30% 出血した時点で、平均血圧はショックレベルまで低下し、蘇生開始時には  $37 \pm$

7.9mmHg であった。

蘇生液の投与により、洗浄赤血球群、HbV 群では血圧の上昇が認められたが、生食群、アルブミン生食群、HES 群ともに当初は血圧の維持が可能であったが、輸液量が循環血液量と等量になると徐々に血圧が低下し、生食群以外は 120 分以内に全例死亡した。



洗浄赤血球および HbV の酸素運搬を有する蘇生液での生存率が優れており、他の群間との間に有意差があった(Log rank test)。生理食塩水投与群では蘇生後 90 分を超えて生存する例が多かったが、120 分経過時の生存率は 29% であり後述する pH、乳酸レベルから、組織・臓器循環には大きな障害が起きていることがうかがえた。

### 2. 平均血圧の変動

出血のスピードは  $0.6 \sim 3\text{ml/min}$  (中央値  $1.7\text{ml/min}$ ) であり、50kg のヒトに換算すると  $100 \sim 500\text{ml/min}$  ( $250\text{ml/min}$ ) という大量出血の状態であった。血圧は速やかに低下し、出血性ショックの状態に陥った。(図 2)

蘇生を開始しても出血が持続するために血圧はなかなか上昇しない動物も多かった。50% 出血の時点では洗浄赤血球群の平均血圧が上昇し、他の HbV 群、アルブミン生食群、HES 群、生食群との間に有意差を認めた。100% 出血時には HbV 群でも血圧の上昇が認められた。wRBC 群、HbV 群とアルブミン生食群、HES 群、生食群との間に有意差を認めた。100% 出血ののちに HES 群とアルブミン