

201009003A

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22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23(2011)年5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 I C U 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 22 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 23 (2011) 年 5 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）	6～9
2. 泉 陽太郎（慶應義塾大学医学部 講師）	10～13
3. 小松 晃之（中央大学 理工学部 教授）	14～15
4. 富田 裕（慶應義塾大学医学部 講師）	16～20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21～24
IV. 研究成果の刊行物・別冊	25～

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 (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確立されつつある。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の構築を目指し、検討を行った。今回は人工呼吸器管理、SIRS、出血性ショック特に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。

①人工呼吸器管理は ICU 管理においてほぼ必須である。しかし、人工換気の副作用ともいえるそれ自身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追加検討した。5%アルブミン分散液を用いて交換率 60%まで人工赤血球使用量を増加させ検討を行った。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く、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。

②Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)は全身の炎症性カスケードが亢進した状態であり、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。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 状態の評価モデルとして腸間膜リンパ節の採取および培養方法を検討してきた。本研究では様々なかたちで腸管を損傷し、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。これらのモデルいくつかではマウス腸間膜リンパ節の培養の陽性所見が得られた。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。また肺組織の DNA チップ解析では Stefin A の上昇が顕著であった。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本研究ではヘモグロビンを基盤とした新たな人工酸素運搬体として、ヒト血清アルブミン (HSA)

にヘムを包接させたアルブミン-ヘムの基礎的物性を検討した。ヒト血清アルブミン (HSA) にヘムを包接させたアルブミン-ヘムは、ヘモグロビン (Hb) 小胞体 비해簡便に調製できる人工酸素運搬体であるが、煩雑な合成ヘムの調製や酸素錯体の安定度には課題も残されていた。そこで本研究では、生体内で酸素輸送のできる新しい人工酸素運搬体の開発を目的とし、Hb に HSA を結合した Hb/HSA_n 複合体 (n=1~4) を合成し、その構造、物性に関する検討を行った。Hb/HSA_n 複合体の等電点は 5.1~5.2 と低く、粒径は HSA 結合数に伴い増加した。

④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 講師
小松 晃之 中央大学 理工学部 教授
富田 裕 慶應義塾大学医学部 講師

A. 研究目的

現在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多角的な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ける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 SIRS、出血性ショック時における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。更にヘモグロビンを基盤とした新たな人工酸素運搬体としてアルブミン-ヘムの基礎的物性を検討した。

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 モデルを用いて血中人工赤血球 Hb 小胞体 (HbV) の存在が肺障害 (VILI) 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 が誘導されることはすでに確認済みである。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 Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)のモデル作成についてさらに検討を進めた。 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この知見はラットにおいては再現が困難であった。本研究ではラットに加えマウスを用い、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。いくつかの手技による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 Hb のリシン残基にピリジルジチオ基を導入するため、CO 化 Hb のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液 ([COHb]=100 μ M) に、架橋剤 *N*-Succinimidyl-6[3'-(2-pyridyldithio)propionamido]hexaneate (SPDPH) の PBS 溶液を添加し (SPDPH/Hb=18

(mol/mol))、30 min 攪拌後、限外濾過で未反応の SPDPH を除去することにより、Hb-PDPH 溶液 (100 μ M) を得た。次に、HSA のリン酸緩衝水 (PB) 溶液 ([HSA]=100 μ M) に、Dithiothreitol (DTT) 溶液を添加し (DTT/HSA=12 (mol/mol))、同じく限外濾過で未反応 DTT を除去することにより、HSA-SH 溶液 (500 μ M) を得た。その HSA-SH 溶液に、ゆっくりと Hb-PDPH を滴下し (HSA/Hb=10 (mol/mol))、20 hr、室温・遮光下で反応させることで、Hb/HSA_n 複合体を合成した。得られた混合物を Superdex G200 カラム (2.5 cm×60 cm) で分画精製し、主要な 4 つのピークに相応する成分を回収した。分離の確認は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定、Native-PAGE 測定により行った。単離した 4 種類の各多量体成分について、シアノメトヘモグロビン法により Hb 濃度、660 nm 法により蛋白質濃度を定量し、HSA/Hb 比を決定した。また、等電点電気泳動 (IEF) から等電点 (pI 値)、動的光散乱 (DLS) から粒径分布を測定した。

得られた Hb/HSA_n 複合体に酸素または一酸化炭素を通気し、その可視吸収スペクトル測定から、酸素または一酸化炭素の結合を確認した。

D イソフルランで麻酔した C57BL/6J マウス (10-12 週齢、体重 22-25g、各群 n=6) の左側頭頭頂部に硬膜温存下で頭窓を作成し、脳表に固定した酸素電極 (POE-10N, バイオリサーチセンター) およびモニター (PO2-100DW, インターメディカル) により、脳表酸素分圧を測定した。近接部位にレーザードップラー血流計 (ALF21R, アドバンス) のプローブを固定し、乾燥を防ぐために密閉した。両側大腿動脈にカテーテルを挿入し、一方を動脈血圧測定用、他方を脱血および採血用とし、経時的 (脱血前、脱血 10 分後、再注入から 10、40、120、240 分後) に 0.05ml 採血して血液ガス分析装置 (RapidLab348, Siemens) により血液ガスおよび血中電解質濃度を測定した。脳表酸素分圧、脳血流、小動物用血圧計 (室町機械) による血圧は多チャンネル記録計 (PowerLab 8/30, ADInstruments) を用いて連続的に記録した。測定パラメーターが 10 分以上安定していることを

確認し、大腿動脈カテーテルから約1分間で0.6ml脱血した。20分後、同量の生理的食塩水、人工赤血球懸濁液あるいは全血を投与し、4時間観察し、5時間後に麻酔を停止して覚醒させた。

また、適宜尾静脈カテーテルからFITCラベル赤血球を注入し、頭窓における血流動態をビデオカメラ(30 frames/s)を用いて観察、連続記録した(Tomita M, et al. *Microcirculation*. 15: 163-174, 2008. Unekawa M, et al. *Asian Biomed*. 2: 203-218, 2008.)。

C. 研究結果・考察

A 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。5%アルブミン溶液群では時間経過とともに動脈血酸素分圧の低下がみられた。これに対して5%アルブミン溶液分散HbV群では動脈血酸素分圧の低下は有意に抑制された。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。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。Hb小胞体は何らかの機構により肺を圧損傷から保護する可能性が示唆された。

B 無処置のマウス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。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。炎症は高度であったが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。炎症の程度を減少させたモデルとして腸管吻合モデルを検討した。縫合針の個数を変えることにより炎症の程度が変化した。3針でほぼモデルとして適切な炎症反応が惹起された。また肺では顕著な炎症所見がみられた。肺組織をDNA

チップにて解析したところStefin Aの顕著な上昇がみられた。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 SPDPHの添加量を変化させることにより、Hb表面に導入するピリジルジチオ基の本数を制御することができた(8~15本)。HSAは分子内に還元型Cysを1つ(Cys-34)しか持たないため、得られる複合体は必ずHbをコアとするクラスター状分子となる。反応混合物のNative-PAGEおよびHPLCの流出曲線には、未反応HSA、未反応Hbの他に、高分子量域に新しく4つのバンドおよびピーク(No. 1~4)が現れた。Superdex G200カラムを用いたGPCにより、これらの成分を分画精製することができた。No.1~3はそれぞれ、Hb/HSA₄複合体(5量体)、Hb/HSA₃複合体(4量体)、Hb/HSA₂複合体(3量体)であることがわかった。等電点(pI)はいずれも5.1~5.2と低く、Hb(pI=6.8)の周囲に負電荷を持ったHSA(pI=5.0)が結合することで、表面電荷が大きく低下したと考えられる。さらに、粒径はHSAの結合数が増えるに従い増加した。

Hb/HSA₃複合体の酸素結合に伴うUV-vis. スペクトル変化とその λ_{max} 値はHbと同一であり、HSAが結合したことによるヘムの電子状態に与える影響はない。

通常、 $\alpha_2\beta_2$ の4つのサブユニットからなるHb分子は、 $\alpha\beta$ の二量体に容易に解離するが、Hb/HSA_n複合体中心のコアHbはHbに比べ解離しにくいことがわかった。HSA分子に囲まれたコアHbが立体的に安定化されているためと推察される。

E 0.6mlの脱血により平均血圧は 86.4 ± 9.0 mmHgから 52.9 ± 12.3 mmHgに低下し、PO₂はベースレベルより 8.2 ± 7.6 mmHg低下し、CBFは $21.7 \pm 14.2\%$ 低下した。脱血時のこれらのパラメーターに群間で有意な差はなかった。生食の投与により血圧、PO₂、CBFいずれも一時的に回復したが、徐々に低下して5時間以内に全例死亡した。全血を投与すると血圧は脱血前のレベルまで回復してゆるやかに低下した。PO₂とCBFは脱血前より

高いレベルで維持され、5時間後まで死亡例はなく、2例は覚醒し、1例は1週間以上生存した。人工赤血球を投与すると、血圧の変化は生食群、全血群の中間のレベルであった。PO₂とCBFは一過性の上昇が認められず、ベースに近いレベルを維持した。5時間後まで半数が生存したが、覚醒することはなかった。

脱血により PaO₂ は 92.2 ± 10.0 mmHg から 113.2 ± 8.0 mmHg に上昇、PaCO₂ は 40.3 ± 4.8 mmHg から 33.9 ± 4.2 mmHg に低下、Hct は 46.3 ± 2.4 % から 37.5 ± 3.5 % に低下し、いずれも 3 群間で有意な差はなかった。生食の酸素分圧は 186.3 ± 5.9 mmHg であり、生食の投与によって PaO₂ は高いレベルに維持されたが、PaCO₂ は低レベルのままであった。全血の投与によって PaO₂ はほぼ脱血前のレベルを維持し、PaCO₂ は上昇した。人工赤血球懸濁液の酸素分圧は生食に近い 194.5 ± 12.8 mmHg であっ

たが、投与後の PaO₂ は全血の場合と同様に脱血前に近いレベルに回復し、PaCO₂ は全血の場合より有意に小さい変化であった。Hct は生食投与群では低レベルのままであったが、人工赤血球の投与によって全血投与群よりは低いものの脱血前に近いレベルを維持した。血中電解質濃度 (Na⁺, K⁺) および pH はいずれも 3 群間で有意な差はなかった。

D. 結論

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、出血性ショック、脳微小循環への影響、さらにヘモグロビンを基盤とした人工酸素運搬体アルブミン-ヘムの基礎的物性を検討した。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。

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
	森崎 浩	慶應義塾大学医学部	麻酔科	准教授

研究要旨

人工呼吸器管理は集中治療室 (ICU) においてはほぼ必須である。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、特に悪影響を及ぼすか否かについて検討を重ねた。元来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)。本研究ではウサギを用いた 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 群では VILI の度合いが 5% アルブミン投与と比較して軽減される可能性が示唆された。

A. 研究目的

集中治療室(Intensive Care Unit: ICU)における代表的な管理法の一つ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、障害肺の機能を補助する。ただし換気方法は胸郭を筋肉により拡張してその陰圧により肺を拡張させる生理的な呼吸とは異なり外から空気を送り込む陽圧換気となる。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。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した。このモデルの一つとしてウサギを用いた VILI モデルがある。本研究ではこのモデルを用いて、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。

B. 研究方法

動物種：雄、日本白色家兎 (2.0~2.5 kg)。

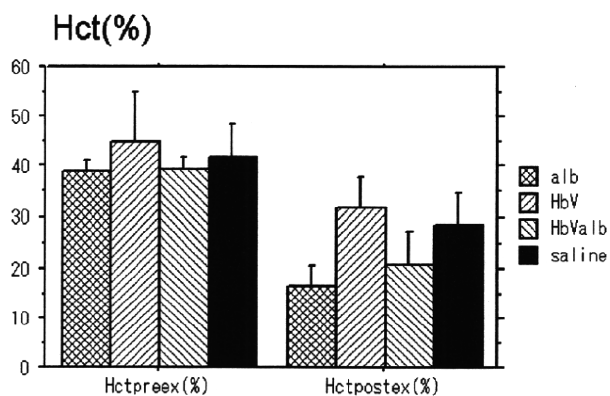
実験操作：麻酔導入薬としてケタミン 100 mg を筋注。鎮静が得られた後 22G 針にて耳静脈を確保した。耳静脈より鎮静薬 0.5% ペントバルビタール 4 ml/kg/hr の投与を開始した。頸部に枕木をあて、仰向けに固定した。頸部および胸部腹側を剃毛した後消毒を行った。頸部に局所麻酔薬 0.5% リドカイン 3 ml を皮下投与した。頸部に皮切を加え気管切開を施行し、気管周囲を剥離した。気管近傍の

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、筋弛緩薬パンクロニウム 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 にてパ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

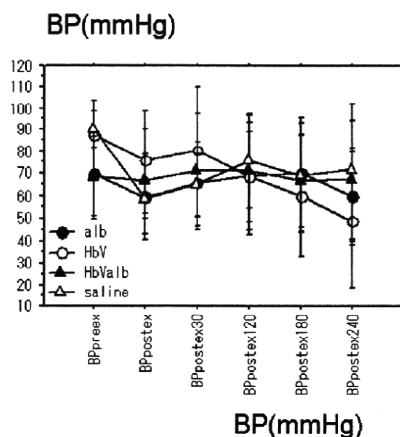
予備実験として生理食塩水群を行ったが 60%交換では実験期間中の生存が維持できなかった。こ

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 37±3% から交換後 15±4%、alb 群では交換前 36±3% から交換後 17±8%、へ低下した。



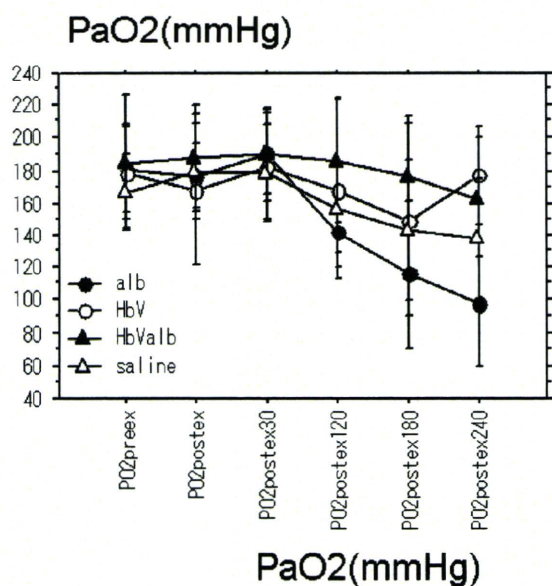
両群間に有意差は無く、両群ともに循環血液量のほぼ 60% が実際に交換されたと考えられた。Alb 群で若干ヘマトクリットの低下が顕著であったが、循環動態が HbV 群に比較して不安定であった点と関連があったかもしれない。いずれの群でも膠質である 5%アルブミンを含む試料ではより循環血液量が保たれるためか、交換後のヘマトクリットは生理食塩を使用した実験に比べてやや低めであった。

平均体血圧は麻酔深度の影響もあり全体的に低めに推移した。時間とともに徐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)。肺障害が急性に進行するモデルであり、麻酔深度は深く保つ必要があるため、このようなデータとなった。また群間に明らかな差は見られなかった。

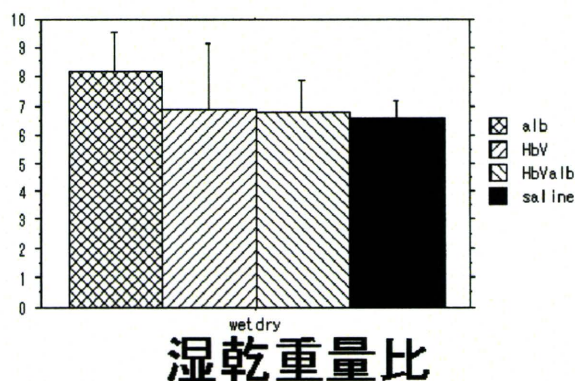


生理食塩水をベースにした試料では、血液希釈が起こり、その結果循環血液量が低下するため、血圧の低下さらに生存率の低下につながったと考えられたが、この傾向は5%アルブミンに分散した際には軽減されると考えられ、今回の実験においても5%アルブミンに分散したためか交換率を60%に増加したにもかかわらず安定であった。

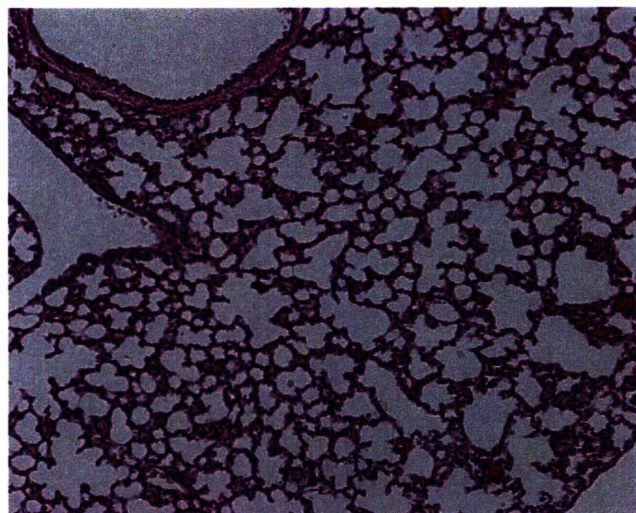
動脈血酸素分圧は時間経過とともに両群で若干低下傾向が見られた。(preex:脱血交換前、postex:脱血交換後)。Alb群では時間経過とともに有意な低下がみられたが、HbValb群では有意な低下は見られず、alb群に比べて有意に高く推移した。



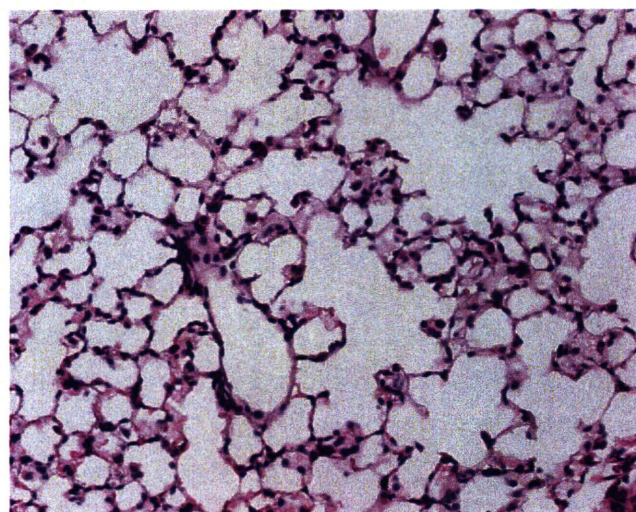
さらに肺への水分貯留量、すなわち肺水腫/肺障害を反映する指標となる湿乾重量比はalb群に比べてHbVを含んだ試料で低く抑えられた。



採取した肺のHE染色においては両群で肺水腫の存在が疑われた。その程度はalb群で



HbValb群より高い可能性が疑われた。



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。

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。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有意に維持される結果となり、この機序についてさらなる検討を要する。

D. 結論

人工赤血球を ICU で使用する場合、そして人工呼吸器管理下の使用に際して高頻度に合併、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。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. Response time of different methods of cardiac output monitoring during cardiopulmonary resuscitation and recovery.
2. Nishiwaki C, Kotake Y, Yamada T, Nagata H, Tagawa M, Takeda J. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2010 ;24(2):306-8.
3. Remifentanyl for Awake Thoracoscopic Bullectomy. Inoue K, Moriyama K, Takeda J. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2010 ;24(2)386-387
4. Hiroyuki Seki • Sadatomo Tasaka • Koichi Fukunaga • Yoshiki Shiraishi • Kiyoshi Moriyama

•Keisuke Miyamoto • Yasushi Nakano • Naoko Matsunaga • Katsunori Takashima •Tatsumi Matsumoto • Masayuki Ii • Akitoshi Ishizaka • Junzo Takeda. Effect of Toll-like receptor 4 inhibitor on LPS-induced lung injury. *Inflamm Res.* 2010 Oct;59(10):837-45.

5. ベクロニウムとスキサメトニウムは捨てがたい. 武田純三. *日臨麻会誌.* 30(3):436-445,2010
6. Kiyoshi Katsumata, Jun Nishiyama, Takefumi Inoue, Noboru Mizushima, Junzo Takeda, Michisuke Yuzaki. Dynein- and activity-dependent retrograde transport of autophagosomes in neuronal axons. *Autophagy* 6:3, 378-385;2010
7. Regional spinal cord cooling using a countercurrent closed-lumen epidural catheter. Shimizu H, Mori A, Yamada T, Ishikawa A, Okano H, Takeda J, Yozu R. *Ann Thorac Surg.* 2010 Apr;89(4):1312-3.
8. 気管切開が施行不能であった頸部海綿状血管腫の 1 症例. 壽原朋宏、森山 潔、細川幸希、藍公明、武田純三. *麻酔.* 59:618-621,2010/07/10
9. Sakuraba S, Hosokawa Y, Kaku Y, Takeda J, Kuwana S. Laudanosine has no effects on respiratory activity but induces non-respiratory excitement activity in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2010; 669: 177-80.
10. Effect of JM-1232(-), a New Sedative on Central Respiratory Activity in Newborn Rats. Junya Kuribayashi, Shun-ichi Kuwana, Yuki Hosokawa, Eiki Hatori, Junzo Takeda. *Adv Exp Med Biol.* 2010;669:115-8.

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 講師

研究要旨

集中治療室 (ICU) 管理を要する症例の多くは現疾患に加え合併症を併発して居る症例が多く、これらの合併症を反映する状態として Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) がある。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り、ある程度共通した治療法が必要である。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、また術後に人工赤血球投与を要する症例の少なくとも一部には SIRS 状態あるいは潜在する SIRS 状態が見られ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有効かつ実行可能な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。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結紮後穿刺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が、炎症が強く安定したモデルにはならなかった。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が、再現性と評価の定量性に問題が見られた。また、マウスを用いた盲腸結紮後穿刺モデルでは限局性の腹膜炎が発生し再現性が見られたが炎症が強く安定したモデルにはならなかった。このため本実験では縫合の数によって腹膜炎の程度を調整できる腸管縫合不全のモデルを採用しさらなる最適化をはかった。このモデルでは腸間膜リンパ節腫大が高率に見られ、リンパ節培養にて大腸菌、腸球菌、B 溶連菌が検出された。また肺組織における変化も顕著に見られた。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 においては各原因疾患別の治療法は重要であるが、それとともに呼吸、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、

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が Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) である。SIRS は多岐にわたる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代表的な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。本研究では類似したモデルを検討し、作成が比較的容易であり、再現性が高い動物モデルを樹立することを目指した。動物種としては入手可能かつハンドリングのよいマウスを検討することとした。ま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、少なくともマウスにおいては、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、腸管の損傷モデルおよび腸管縫合不全モデルを検討した。特に腸管縫合不全モデルでは縫合数によって炎症の程度を調節できる可能性が示唆された。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重ねた。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および縦隔リンパ節においてもさらなる検討を行った。

B. 研究方法

動物種：マウス、C57Bl/6、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。また胸腔内肺組織および縦隔リンパ節の観察も行った。

実験①：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 1 mm 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 日後から 1 週間後に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。また胸腔内肺組織および縦隔リンパ節の観察も行い、リンパ節の嫌気性および好気性培養検査を行った。

実験②：腹部正中切開を行い、盲腸と回盲部を腸間膜脈管を損傷しないように切断し、再度腸管吻合を行った。吻合糸の数を変化させ、吻合不全のモデルを作成した。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、組織学的検討を行った。また DNA チップによる網羅的解析を試みた。また縦隔リンパ節の観察も行い、リンパ節の嫌気性および好気性培養検査を行った。

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

無処置のマウスにおいても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した。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、病理組織学的にもこれらがリンパ節であることを確認した。

実験①マウスの活動性、食欲は実験②に比べ著明に低下、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 から 2 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、その程度は昨年度の実験とほぼ同等であった。好気性培養にて大腸菌、腸球菌、B群溶連菌が数回検出された。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に比べ肺水腫、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。肺におけるガス交換の低下が死亡原因の一つと考えられた。

実験②腸管縫合糸を4針から8針の間を変化させてモデルを作成し、さらなる検討を行った。8針では縫合不全は起こらなかったが、



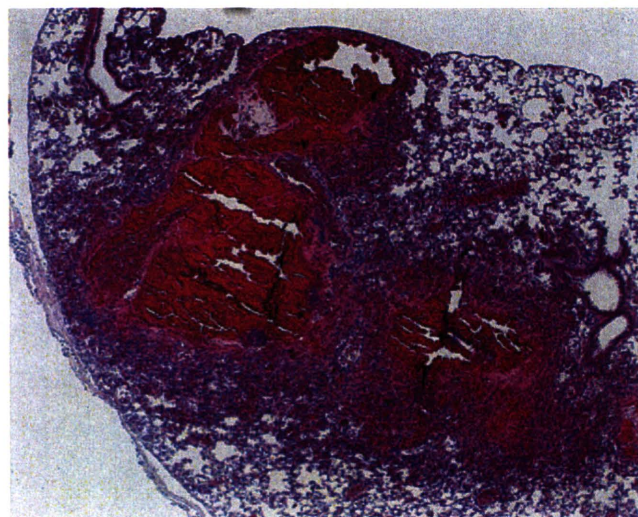
3針の縫合では、腸間膜リンパ節所見には有意な腫大が見られ、好気性培養にて大腸菌、腸球菌、B群溶連菌が検出された。死亡例はみられず、全身状態は比較的良好であったが肺の所見は実験②とほぼ同様に顕著であった。縦隔リンパ節は軽度の腫大が見られたが、培養結果は陰性であった。肺は肉眼的に明らかに赤みが増しており、固定時のホルマリン注入にても拡張は明らかに不良、肺水腫および肺胞内出血が疑われた。

病理組織所見では対照群に比べ肺水腫、肺胞内出血、肺胞隔壁の肥厚および白血球浸潤が見られ、その程度は実験①よりも顕著であった。



4針では縫合不全が発生した。

マウスの縫合不全発生群ではマウス体重は軽度減少したが、死亡例は見られなかった。この意味で実験①より適切なモデルと考えられた。ただし腸間膜リンパ節所見としては有意な腫大は見られなかった。さらに3針の縫合数を減らした。この結果縫合部における限局性腹膜炎が見られ、同部位に高度な癒着が見られた。2針では死亡例が見られた。



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間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。これらの知見から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が、腸管膜リンパ節培養陽性所見は不安定であった。また今回行ったマウス盲腸結紮後穿孔モデルでは、顕著な限局性腹膜炎が見られ、また腸間膜リンパ節の腫大、好気性菌培養陽性所見が得られたが、死亡例もみられモデルとしての安定性に欠けた。これに対し今回検討した腸管吻合モデルではマウスの全身状態は保たれた状態で 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る。DNA チップを用いた肺組織の解析では腹膜炎誘発群で Stefin の顕著な上昇が見られた。Stefin A は cysteine protease inhibitor であり、炎症所見を反映する新たなマーカーとなる可能性が示唆される興味深い知見が得られた。特に SIRS に関連する肺障害因子について今後解析が必要である。

D. 結論

本実験では、動物における SIRS モデル作成を継続した。腸間膜リンパ節の培養では盲腸結紮後穿孔モデルにて陽性結果が得られたが、本モデルでは全身状態の悪化が顕著であった。これに対し腸管縫合不全を模したモデル、特に 3 針による縫合はより安定していた。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。縦隔リンパ節の腫大も見られた。SIRS における人工赤血球投与時に影響を評価するより安定した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

論文発表

1. Takahashi Y, Izumi Y, Kohno M, Kimura T, Kawamura M, Okada Y, Nomori H, Ikeda E.
2. Thyroid transcription factor-1 influences the early phase of compensatory lung growth in adult mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Jun 15;181(12):1397-406.
3. Yamauchi Y, Kohno M, Hato T, Hayashi Y, Izumi Y, Nomori H. A non-invasive thymoma that occurred 29 years after complete resection of a non-invasive thymoma accompanied by a microthymoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2010 Oct;40(10):986-8.
4. Asakura K, Izumi Y, Ikeda T, Kimura Y, Horinouchi H, Hayashi Y, Nomori H. Mediastinal germ cell tumor with somatic-type malignancy: report of 5 stage I/II cases. *Ann Thorac Surg.* 2010 Sep;90(3):1014-6.
5. Takahashi Y, Izumi Y, Kohno M, Kawamura M, Ikeda E, Nomori H. Airway administration of dexamethasone, 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate, and isobutylmethylxanthine facilitates compensatory lung growth in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 Mar;300(3):L453-61.
6. Nakatsuka S, Yashiro H, Inoue M, Kuribayashi S, Kawamura M, Izumi Y, Tsukada N, Yamauchi Y, Hashimoto K, Iwata K, Nagasawa T, Lin YS. On freeze-thaw sequence of vital organ of assuming the cryoablation for malignant lung tumors by using cryoprobe as heat source. *Cryobiology.* 2010 Dec;61(3):317-26.
7. Asakura K, Izumi Y, Kohno M, Ohtsuka T, Okui M, Hashimoto K, Nakayama T, Nomori H. Effect of cutting technique at the intersegmental plane during segmentectomy on expansion of the preserved segment: comparison between staplers and scissors in ex vivo pig lung. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011 Mar 28.

分担課題：アルブミンを用いた人工酸素運搬体に関する検討

分担研究者 小松 晃之 中央大学 理工学部 教授

研究要旨

ヒト血清アルブミン（HSA）にヘムを包接させたアルブミン-ヘムは、ヘモグロビン（Hb）小胞体に比べ簡便に調製できる人工酸素運搬体であるが、煩雑な合成ヘムの調製や酸素錯体の安定度には課題も残されていた。そこで本研究では、生体内で酸素輸送のできる新しい人工酸素運搬体の開発を目的とし、HbにHSAを結合したHb/HSA_n複合体（n=1~4）を合成し、その構造、物性に関する検討を行った。Hb/HSA_n複合体の等電点は5.1~5.2と低く、粒径はHSA結合数に伴い増加した。

アルブミンを用いた人工酸素運搬体に関する検討

A. 緒言

ヒト血清アルブミン（HSA, Mw: 66,500）は血漿中に最も多く存在する単純蛋白質であり、膠質浸透圧維持や薬物・代謝産物の運搬、貯蔵などの役割を担っている。我々はこれまで、HSAにヘムを包接させたアルブミン-ヘムの開発と生体内酸素輸送能の評価を進めてきた。アルブミン-ヘムは、

(i) Hb小胞体に比べ調製が簡便、(ii) 分子表面が負に帯電しているため腎臓から排泄されにくい、

(iii) 酸素親和度の調節が可能 など、人工酸素運搬体としての優れた特性を有する。しかし、煩雑な合成ヘムの調製や酸素錯体の安定度には課題も残されていた。そこで本研究では、生体内で酸素輸送のできる新しい人工酸素運搬体の開発を目的として、HbにHSAを結合したHb/HSA_n複合体を合成し、その構造、物性に関する検討を行った。

B. 研究方法

Hbのリシン残基にピリジルジチオ基を導入するため、CO化Hbのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）溶液（[COHb]=100 μM）に、架橋剤 *N*-Succinimidyl-

6[3²-(2-pyridyldithio)propionamido]hexanoate

（SPDPH）のPBS溶液を添加し（SPDPH/Hb=18（mol/mol））、30 min 攪拌後、限外濾過で未反応のSPDPHを除去することにより、Hb-PDPH溶液（100 μM）を得た。次に、HSAのリン酸緩衝水（PB）溶液（[HSA]=100 μM）に、Dithiothreitol（DTT）溶液を添加し（DTT/HSA=12（mol/mol））、同じく限外濾過で未反応 DTT を除去することにより、HSA-SH溶液（500 μM）を得た。そのHSA-SH溶液に、ゆっくりとHb-PDPHを滴下し（HSA/Hb=10（mol/mol））、20 hr、室温・遮光下で反応させることで、Hb/HSA_n複合体を合成した。得られた混合物をSuperdex G200カラム（2.5 cm×60 cm）で分画精製し、主要な4つのピークに相応する成分を回収した。分離の確認は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）測定、Native-PAGE測定により行った。単離した4種類の各多量体成分について、シアノメトヘモグロビン法によりHb濃度、660 nm法により蛋白質濃度を定量し、HSA/Hb比を決定した。また、等電点電気泳動（IEF）から等電点（pI値）、動的光散乱（DLS）から粒径分布を測定した。

得られたHb/HSA_n複合体に酸素または一酸化炭

素を通気し、その可視吸収スペクトル測定から、酸素または一酸化炭素の結合を確認した。

C. 結果および考察

SPDPHの添加量を変化させることにより、Hb表面に導入するピリジルジチオ基の本数を制御することができた(8~15本)。HSAは分子内に還元型Cysを1つ(Cys-34)しか持たないため、得られる複合体は必ずHbをコアとするクラスター状分子となる。反応混合物のNative-PAGEおよびHPLCの流出曲線には、未反応HSA、未反応Hbの他に、高分子量域に新しく4つのバンドおよびピーク(No. 1~4)が現れた。Superdex G200カラムを用いたGPCにより、これらの成分を分画精製することができた。No.1~3はそれぞれ、Hb/HSA₄複合体(5量体)、Hb/HSA₃複合体(4量体)、Hb/HSA₂複合体(3量体)であることがわかった。等電点(pI)はいずれも5.1~5.2と低く、Hb(pI=6.8)の周囲に負電荷を持ったHSA(pI=5.0)が結合することで、表面電荷が大きく低下したと考えられる。さらに、粒径はHSAの結合数が増えるに従い増加した。

Hb/HSA₃複合体の酸素結合に伴うUV-vis. スペクトル変化とその λ_{\max} 値はHbと同一であり、HSAが結合したことによるヘムの電子状態に与える影響はない。

通常、 $\alpha_2\beta_2$ の4つのサブユニットからなるHb分子は、 $\alpha\beta$ の二量体に容易に解離するが、Hb/HSA_n複合体中心のコアHbはHbに比べ解離しにくいことがわかった。HSA分子に囲まれたコアHbが立体的に安定化されているためと推察される。

D. 結論

Hb分子に複数個のHSA分子を共有結合したHb/HSA_n複合体を初めて合成・単離し、その構造(n=1~4)を明らかにした。Hb/HSA_n複合体の等電点は5.1~5.2と低く、粒径はHSA結合数に伴って増加した。Hb/HSA_n複合体は生体内で酸素を結合解離できる新しい人工酸素運搬体となり得る。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1) 論文発表

1. K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, H. Watanabe, K. Kawai, T. Komatsu, E. Tsuchida, T. Maruyama, M. Otagiri. Superior plasma retention of a cross-linked human serum albumin dimer in nephrotic rats as a new type of plasma expander. *Drug Metab. Dispos.* 38, 2124-2129 (2010).
2. T. Komatsu, X. Qu, H. Ihara, M. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda. Virus trap in human serum albumin nanotube. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 3246-3248 (2010).
3. T. Komatsu, N. Kobayashi. Protein nanotubes bearing a magnetite surface exterior. *Polym. Adv. Technol.* 22 (2011) in press.

2) 学会発表

1. 小松晃之/完全合成系人工酸素運搬体の開発/第17回日本血液代替物学会年次大会/熊本/2010.10.18-19(招待講演)
2. 富田大樹、小松晃之/(ヘモグロビン/アルブミン)ヘテロオリゴマーの合成と酸素結合能/第91日本化学会春季年会/神奈川/2011.03.26-29.
3. T. Komatsu/Structural and Mutagenic Approach to Create Human Serum Albumin-Based Oxygen Carrier/2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies/Honolulu (USA)/2010.12.15-20.

平成 22 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：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	非常勤講師
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	特別研究助教
鈴木則宏	慶應義塾大学医学部	神経内科	教授

研究要旨

人工赤血球 (Hb 小胞体) 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。我々は既に確立したマウス *in vivo* 実験系において、マウス脱血後の人工赤血球投与による影響を検討し、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を示してきた。本研究では、出血性ショックの際の人工赤血球投与の有用性を確かめるため、マウス脱血モデルにおける人工赤血球の再注入時の全身血圧など生理学的パラメーター、脳表酸素分圧、脳血流、生存率などを経時的に詳細に検討し、生理食塩水投与群、全血再投与群と比較した。生理学的パラメーター、脳表酸素分圧、脳血流、生存率などを解析することにより、脱血後に人工赤血球を投与した場合の効果について、より詳細な情報が得られた。出血性ショックの際に、人工赤血球投与が少なくとも一時的には延命効果があることを示唆しており、既に報告した *in vivo* 脳微小循環動態の結果と併せ、さらなるデータの蓄積・検討と展開が期待される。

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。

我々は既に確立したマウス *in vivo* 実験系²⁻⁶⁾ 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、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を示してきた。本研究では、出血性ショックの際の人工赤血球投与の有用性を確かめるため、マウス脱血モデルにおける人工赤血球の再注入時の全身血圧など生理学的パラメーター、脳表酸素分圧、脳血流、生存率などを経時的に詳細に検討し、生理食塩水投与群、全血再投与群と比較した。

B. 研究方法

イソフルランで麻酔した C57BL/6J マウス (10-12 週齢、体重 22-25g、各群 n=6) の左側頭頭頂部に硬膜温存下で頭窓を作成し、脳表に固定した酸素電極 (POE-10N, バイオリサーチセンター) およびモニター (PO2-100DW, インターメディカル) により、脳表酸素分圧を測定した。近接部位にレーザードップラー血流計 (ALF21R, アドバンス) のプローブを固定し、乾燥を防ぐために密閉した。両側大腿動脈にカテーテルを挿入し、一方を動脈血圧測定用、他方を脱血および採血用とし、経時的 (脱血前、脱血 10 分後、再注入から 10、40、120、240 分後) に 0.05ml 採血して血液ガス分析装置 (RapidLab348, Siemens) により血液ガスおよび血中電解質濃度を測定した。脳表酸素分圧、脳血流、小動物用血圧計 (室町機械) による血圧は多チャンネル記録計 (PowerLab 8/30, ADInstruments) を用いて連続的に記録した。

測定パラメーターが 10 分以上安定していることを確認し、大腿動脈カテーテルから約 1 分間で 0.6ml 脱血した。20 分後、同量の生理的食塩水、人工赤血球懸濁液あるいは全血を投与し、4 時間観察し、5 時間後に麻酔を停止して覚醒させた。

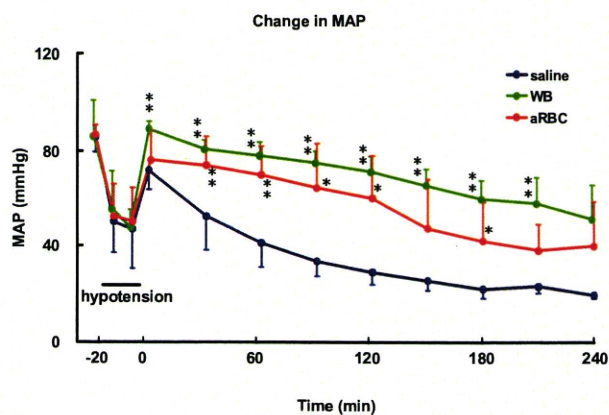
また、適宜尾静脈カテーテルから FITC ラベル赤血球を注入し、頭窓における血流動態をビデオカメラ (30 frames/s) を用いて観察、連続記録した (Tomita M, et al. Microcirculation. 15: 163-174, 2008. Unekawa M, et al. Asian Biomed. 2: 203-218, 2008.)。

C. 結果および考察

0.6ml の脱血により平均血圧は 86.4 ± 9.0 mmHg から 52.9 ± 12.3 mmHg に低下し (図 1)、PO2 はベースレベルより 8.2 ± 7.6 mmHg 低下し (図 2)、CBF は $21.7 \pm 14.2\%$ 低下した (図 3)。脱血時のこれらのパラメーターに群間で有意な差はなかった。生食の投与により血圧 (図 1)、PO2 (図 2)、CBF (図 3) いずれも一時的に回復したが、徐々に低下して

5 時間以内に全例死亡した (図 4)。全血を投与すると血圧は脱血前のレベルまで回復してゆるやかに低下 (図 1) した。

(図 1)



PO2 (図 2) と CBF (図 3) は脱血前より高いレベルで維持され、
図 2)

