

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%

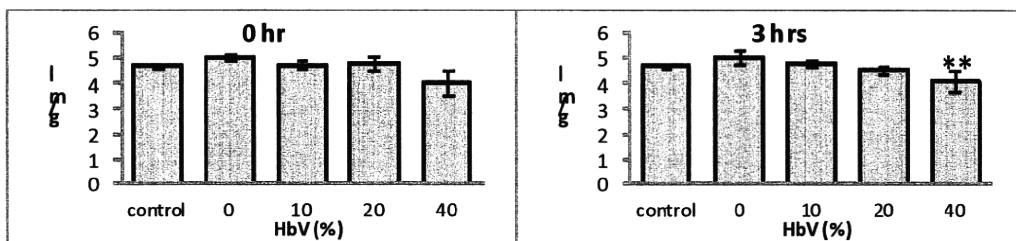


Fig. 2 プロカインアミドに対する影響 ** p<0.01 vs. HbV 0%

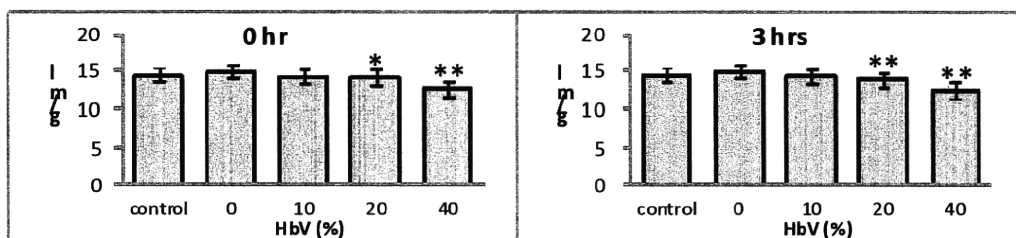


Fig. 3 フェノバルビタールに対する影響 * p<0.05, ** p<0.01 vs. HbV 0%

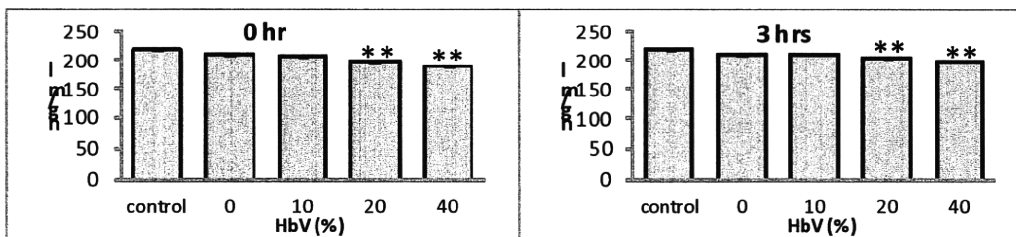


Fig. 4 ジアゼパムに対する影響 ** p<0.01 vs. HbV 0%

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).

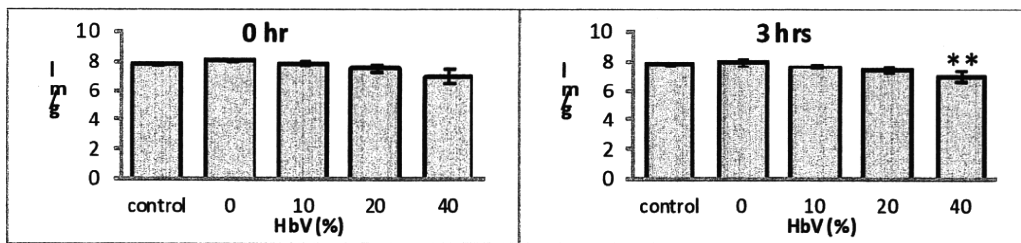


Fig. 5 トブラマイシンに対する影響 ** p<0.01 vs. HbV 0%

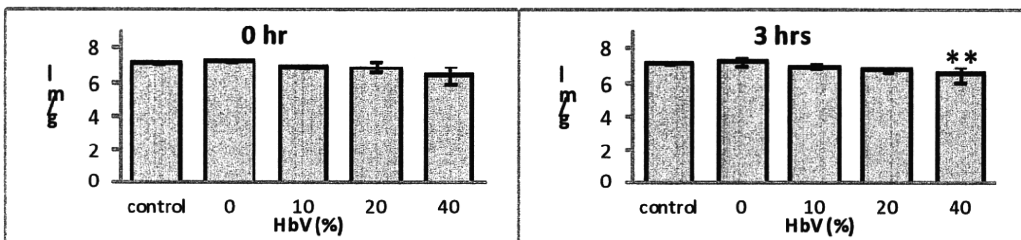


Fig. 6 ゲンタマイシンに対する影響 ** p<0.01 vs. HbV 0%

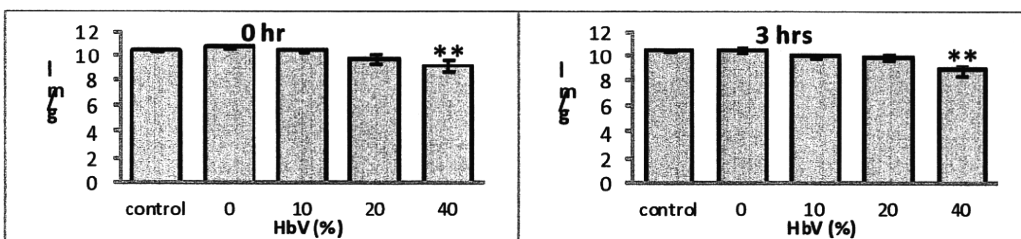


Fig. 7 テオフィリンに対する影響 ** p<0.01 vs. HbV 0%

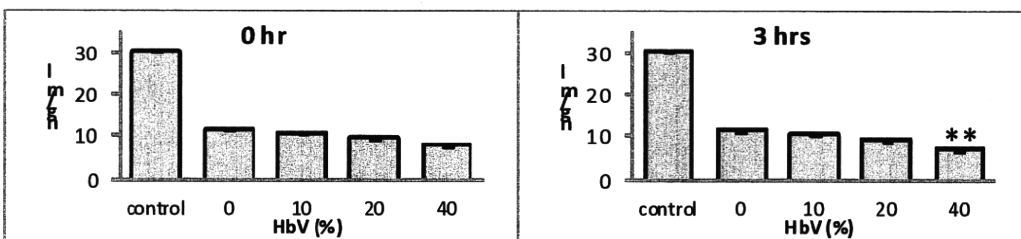


Fig. 8 ハロペリドールに対する影響 ** p<0.01 vs. HbV 0%

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で比較すると、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ポプロテインおよび 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 を内包するリポソームに薬剤が吸着またはリポ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

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

④

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 (SpO₂) 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。

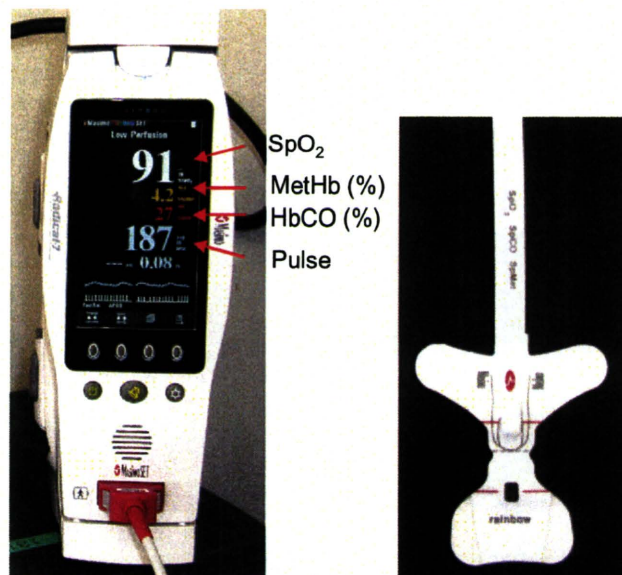


図 1 パルスオキシメータ (Radical-7, Masimo 社製) のモニター部とセンサー部

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兔 (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.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兔の足部を脱毛し、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 (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 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、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。

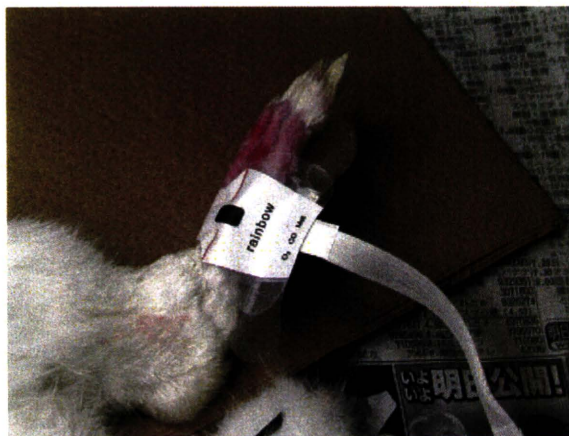


図 2. 粘着センサの装着場所

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。

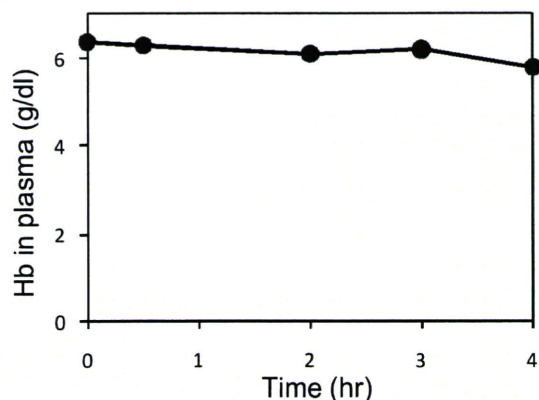


図 3. Hb 小胞体由来の Hb の血漿中濃度の推移

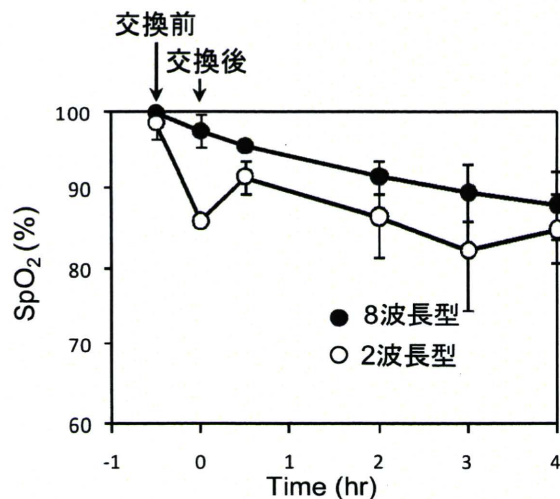


図 4. 動脈酸素飽和度 (SpO₂) のモニター値推移

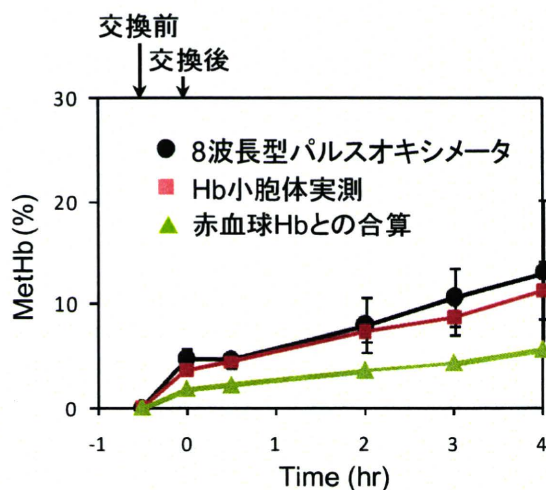


図 5. MetHb 含量のモニター値推移

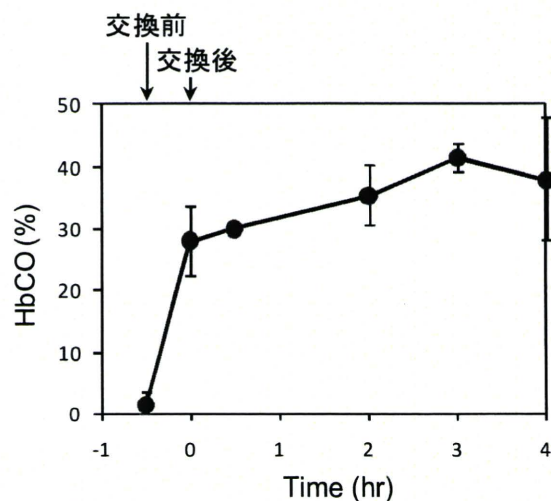


図 6. HbCO 含量のモニター値推移

図 4, 5, 6 にパルスオキシメータでモニターした SpO₂、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 SpO₂ 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。SpO₂ 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 SpO₂ 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 SpO₂ が低下する傾向を認めた。SpO₂ 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 SpO₂ 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 SpO₂ 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 SpO₂ 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 SpO₂ 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、SpO₂ 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 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。

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。

⑤

A. 研究目的

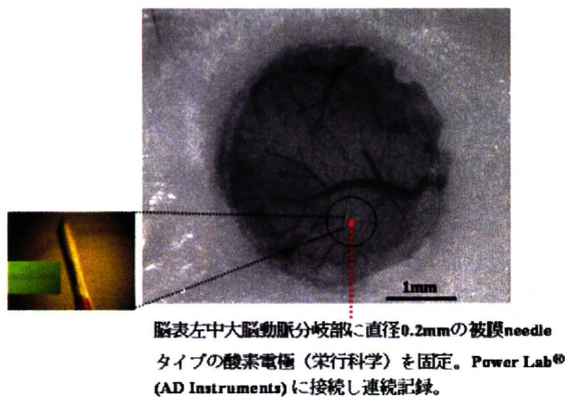
人工赤血球(Hb 小胞体)¹⁾ はヒト赤血球よりも 1/30 の小粒径で粘度も低く、既に出血性ショック時における蘇生液として検証され、赤血球と同等の酸素運搬機能を有することが示唆されている。血液型を問わず、室温で備蓄可能なことから、Hb 小胞体を緊急時に投与することにより出血性ショック状態の患者を蘇生させる可能性が期待される。しかし、出血性ショック時の Hb 小胞体投与による脳微小循環に与える影響はいまだ不明である。本

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

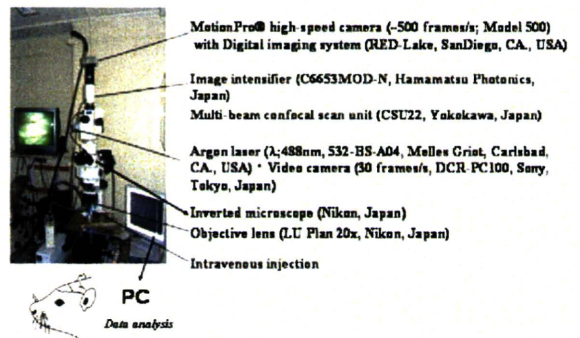
8-12 週齢、体重 22-25g の C57BL/6J マウスを用いた。投与量を微調整することができる小動物用麻酔器 (バイオリサーチ) を用いて、イソフルレン麻酔下、C57BL/6J マウス (n=8) の頭部を定位固定装置に固定、左頭頂側頭葉にて頭蓋骨を開け (2-5)、硬膜は温存した。脳表左中大脳動脈分岐部に酸素電極 (栄行科学) を固定 (Fig.1) し、組織酸素分圧測定器および Power Lab® (AD Instruments) を用いて、脳表の酸素分圧 (PO₂) 変化を連続的にモニタした。

Fig. 1 酸素電極の固定



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 μ m 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 ($\lambda=488$ 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 fluorescence microscope

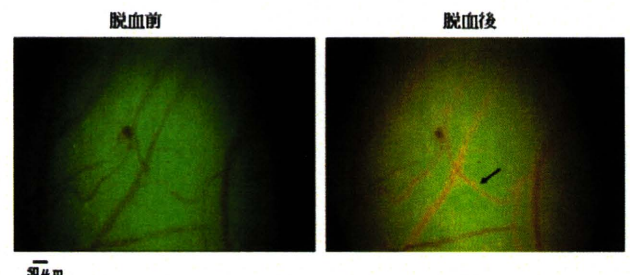


その後、人工赤血球を投与後の脳表の変化、酸素分圧変化を観察・記録した。さらに、各段階における ROI の微小血流速度 (2D flow maps) を血液希釈法に基づく KEIO-IS1 (8,9) にて解析した。

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)。

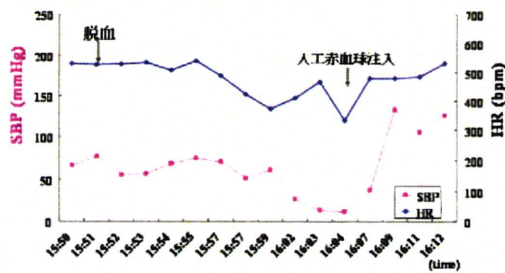
Fig. 3 脱血前・後の脳微小循環動態の *in vivo* 経時的変化



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 ± 15.5 mmHg、 32.9 ± 4.1 mmHg であり、脱血後 25.6 ± 5.6 mmHg、 22.9 ± 2.9 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) の経時的变化



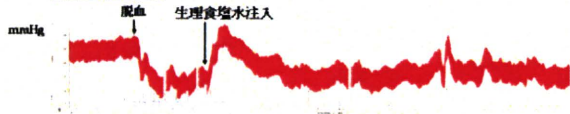
SBPのコントロール値: 80.5 ± 15.5 mmHg
 脱血後のSBPの平均値: 25.6 ± 5.6 mmHg ($n=8$, 統計的に有意な減少 $P<0.05$)
 *呼吸回数には統計的に有意な変動なし。

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に再上昇し、元のレベルまで回復しその後その値が持続した (Fig.5)。

Fig. 5 脳表における酸素分圧 (PO_2) の経時的变化

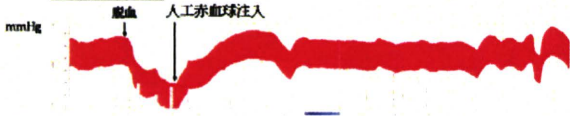
脳表における酸素分圧 (PO_2) のコントロール値: 32.9 ± 4.1 mmHg
 脱血後: 22.9 ± 2.9 mmHg (統計的に有意な減少; $P<0.05$)

生理食塩水注入群



脳表酸素分圧は生理食塩水注入後一過性に上昇したが、数分で下降した。

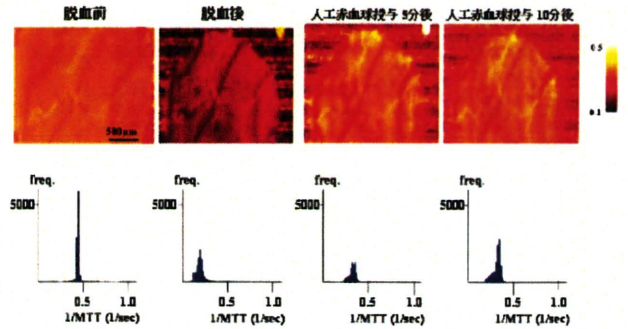
人工赤血球注入群



脳表酸素分圧は人工赤血球注入による上昇後、一時的な数分間の不安定な変化を示した後に再上昇し、元のレベルまで回復しその後その値が持続した。

ROI の平均微小血流速度は、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: 各時期におけるROI (50X50のマトリックス) の速度成分をマッピング。
 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。

平成 21 年度

①

A. 研究目的

集中治療室(Intensive Care Unit: ICU)においては様々な疾患が包括的に集中治療される。病因、主な障害臓器は症例により様々であるが、この際対象症例の多くは肺に何らかの障害がみられる。この場合には全身状態を維持するために肺機能を補助する必要がある、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。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循環血液容量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60%交換を中心に検討した。

C. 研究方法

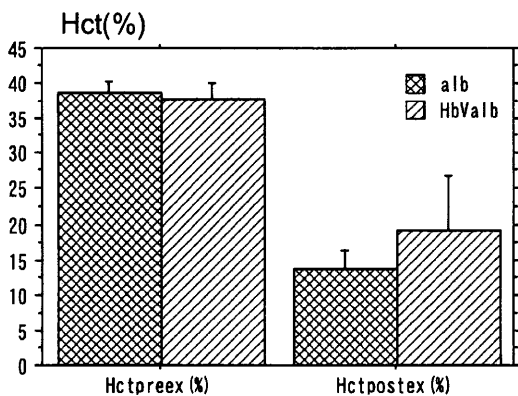
動物種：雄、日本白色家兎 (2.0~2.5 kg)。

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 of 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

昨年度に引き続き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。

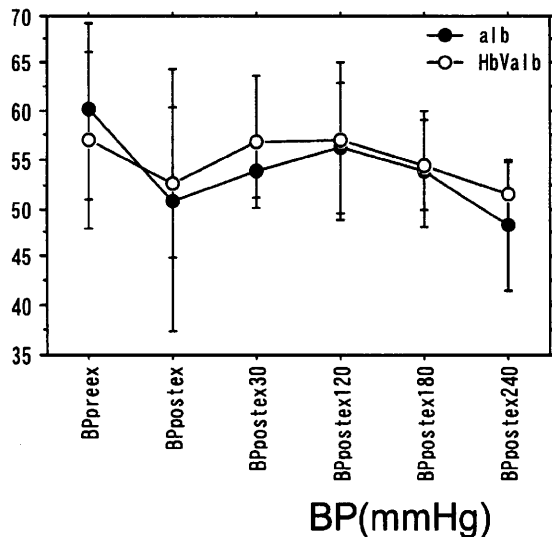


両群間に有意差は無く、両群ともに循環血液量のほぼ 60%が実際に交換されたと考えられた。Alb 群で若干ヘマトクリットの低下が顕著であったが、循環動態が HbV 群に比較して不安定であった点と関連があったかもしれない。いずれの群でも膠質である 5%アルブミンを含む試料ではより循環血液量が保たれるためか、交換後のヘマトクリットは生理食塩を使用した実験に比べてやや低めであった。

平均体血圧は麻酔深度の影響もあり全体的に低

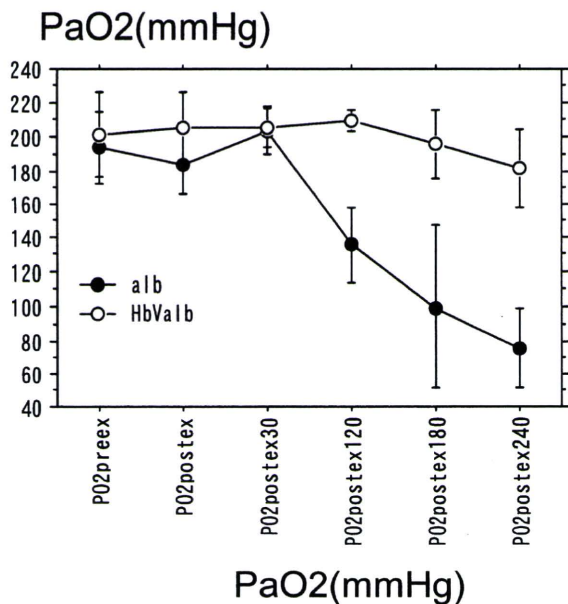
めに推移した。時間とともに徐々にやや低下する傾向はあったものの有意な低下ではなかった (preex: 脱血交換前、postex: 脱血交換後)。肺障害が急性に進行するモデルであり、麻酔深度は深く保つ必要があるため、このようなデータとなった。また群間に明らかな差は見られなかった。

BP(mmHg)

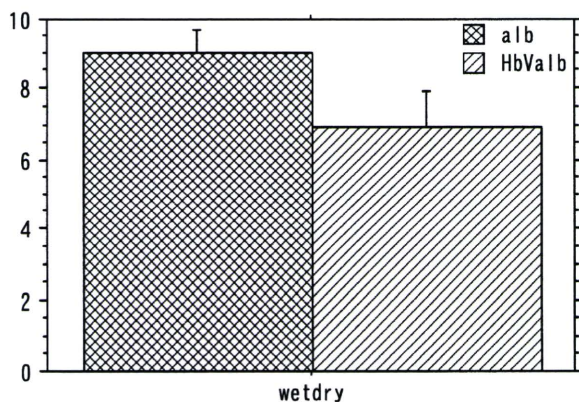


生理食塩水をベースにした試料では、血液希釈が起こり、その結果循環血液量が低下するため、血圧の低下さらに生存率の低下につながったと考えられたが、この傾向は 5%アルブミンに分散した際には軽減されると考えられ、今回の実験においても 5%アルブミンに分散したためか交換率を 60%に増加したにもかかわらず安定であった。

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。



湿乾重量比

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。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。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、様々なシグナル経路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。この意味で、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。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

②

A. 研究目的

ICU の概念は近年変遷を遂げつつあるが、依然として病院の 1 施設としての概念である。各臓器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性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て複数のサイトカインの推移を確認できるモデルを樹立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

損傷モデルおよび腸管縫合不全モデルを検討した。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所見を検討した。

C. 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：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。

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、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

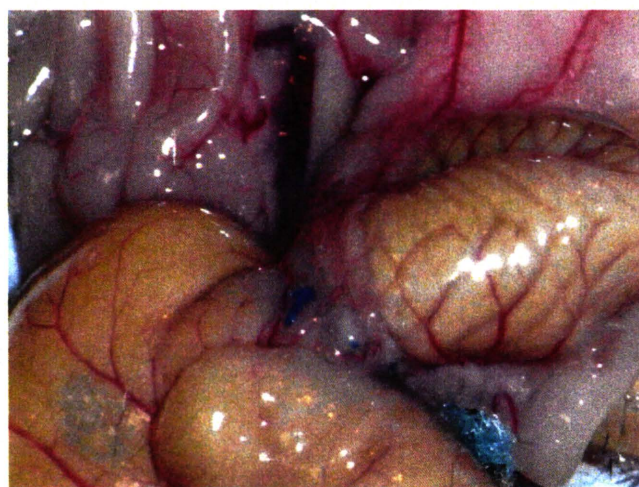
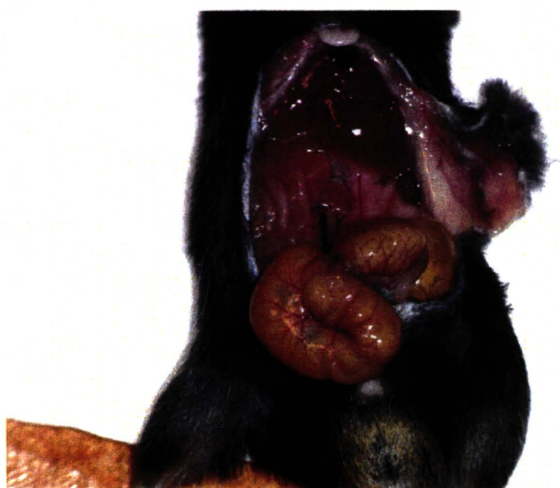
無処置のマウスにおいても上腸管膜動静脈周囲の脂肪組織中には少量のリンパ節が存在した。肉眼的には脂肪組織中に微小なリンパ節が少数確認でき、病理組織学的にもこれらがリンパ節であるこ

とが確認できた。

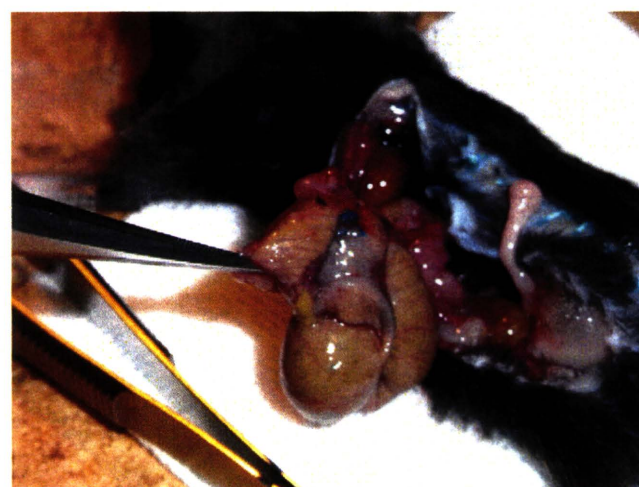
実験①マウスの活動性、食欲は実験②に比べ著明に低下、軟便、下痢が多くのマウスで見られた。2日目以降死亡例も見られ、実験②に比べて有意に高い実験的負荷であった。主に1から2日目に開腹して観察を行った。結紮部より末梢の盲腸部分は全体に黒く変色し壊死に陥っている可能性が示唆された。その周囲には局限されてはいるものの、強い腹膜炎が見られた。癒着が見られ、腹腔内に腹水が存在した。腸間膜リンパ節は腫大していたが、その程度は昨年度の実験とほぼ同等であった。好気性培養にて大腸菌、腸球菌、B群溶連菌が数回検出された。嫌気性培養は陰性であった。

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。

実験②腸管縫合系を4針から8針の間を変化させてモデルを作成した。8針では縫合不全は起こらなかったが、



4針では縫合不全が発生した。

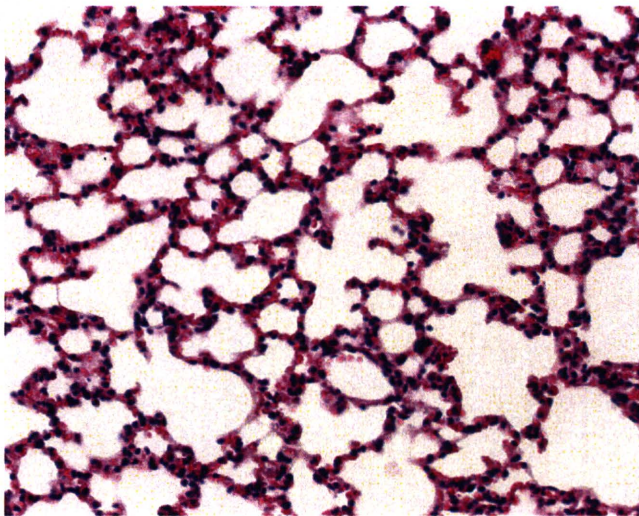


マウスの縫合不全発生群ではマウス体重は軽度減少したが、死亡例は見られなかった。この意味で実験①より適切なモデルと考えられた。ただし腸間膜リンパ節所見としては有意な腫大は見られなかった。

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。胸腔内に異常所見は無かったが、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た。



また、昨年度に引き続き DNA チップを用いて肺の網羅的解析を行った。DNA チップはマイクロアレイに比し低発現領域の比較が可能と考えられている。数百の候補遺伝子があり現在解析中である。

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刺モデルでは、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、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刺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はより安定しておりかつ、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

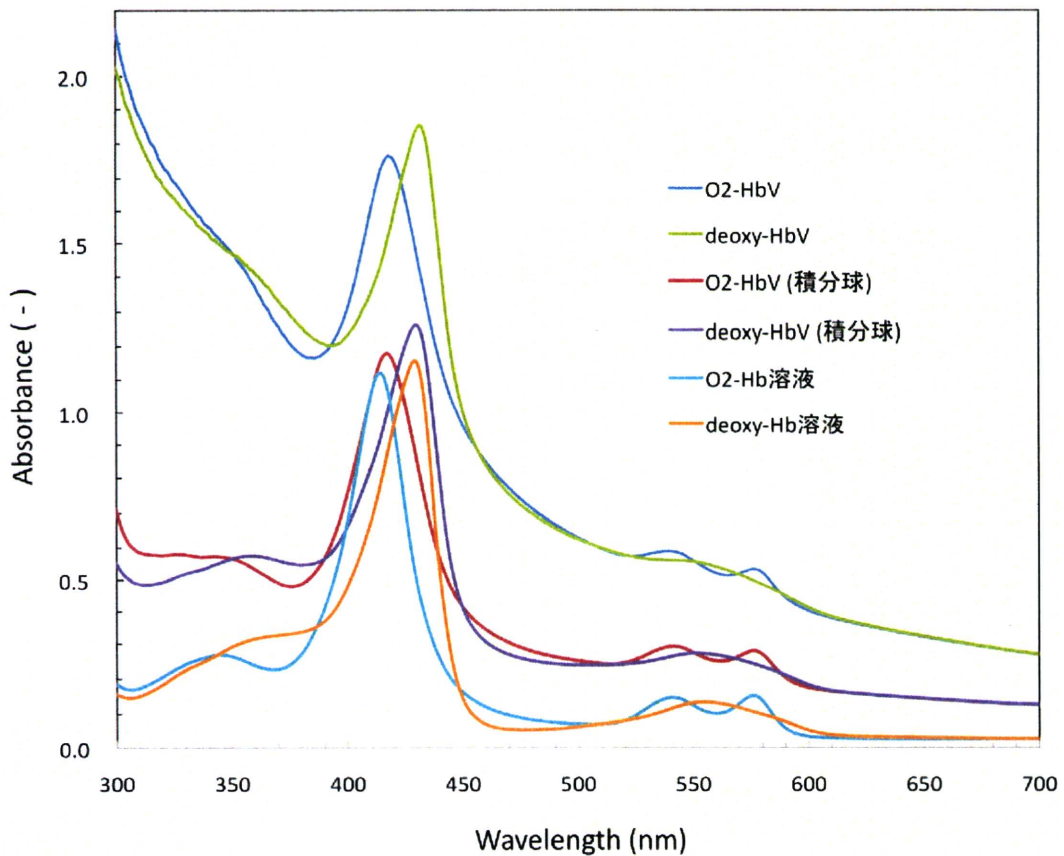


Fig. 1 Absorption spectra of Hb solution and HbV measured with or without an integrating

③

1. ヘモグロビン小胞体分散液の光散乱効果が分光法に与える影響の検討

A. 緒言

ヘモ1. ヘモグロビン小胞体分散液の光散乱効果が分光法に与える影響の検討

A. 緒言

ヘモグロビン小胞体 (HbV) は、濃厚ヒトヘモグロビン (Hb) 溶液をリン脂質小胞体に内包した人工酸素運搬体 (粒子径: 250~280 nm) であり、赤血球と類似の細胞型構造を有する。内包されているHbは赤血球のそれと同一なので、両者の紫外可視吸収スペクトルパターンは必然的に一致するはずである。しかし、実際のHb小胞体分散液の色調は赤血球とは明らかに異なり、乳赤色ともいえるピンクに近い色を呈している。これは光散乱 (Mie scattering) の影響で、粒子径と入射波長が近い場合、牛乳などのエマルジョンが白く見えるのと同じ原

理である (照射された光が吸収せずに散乱光となる)。臨床現場においてはヘモグロビンの可視吸収スペクトルをもとに、血液ガス測定装置、パルスオキシメータ、血球数測定装置などで、Hb濃度、met化率、HbCO濃度、酸素飽和度などを定量的に測定している。赤血球を界面活性剤添加により破壊して測定する場合、Hb小胞体の脂質二分子膜は赤血球膜よりも耐性があるため、測定が阻害されることを以前報告した。また、赤血球を非破壊的に測定する方法 (例えばパルスオキシメータ) においても、Hb小胞体が血中に存在すると、二波長パルスオキシメータ (日本光電製) では酸素飽和度が実際よりも低く測定されることが明らかにされた。この対処法としては、二波長を四波長とし、プログラム変更することで対処できる (須崎ほか, 多波長パルス分光法を用いたHb小胞体用パルスオキシメータに関する研究. 人工血液, 16, 198-204 (2008))。また、最近日本で臨床認可された多波長

(七波長)パルスオキシメータ(マシモ社製)を用いると、Hb小胞体を投与した後も酸素飽和度とmetHbレベルが精度高く測定できることを家兎による実験で明らかにした。しかし、HbCOレベルの測定には誤差があり、光散乱の影響をさらに排除することが課題として残った。

近年、患者への侵襲を抑えるため非接触型の積分球式反射型パルスオキシメータが試験的に開発されている。この装置はHb小胞体による光散乱の影響を低減させるためは有効であると思われる。そこで本研究では、まずHb小胞体の紫外可視吸収スペクトルにおける光散乱の影響を明らかにするため、積分球を用いたスペクトル測定を行い、分光学的に詳細な検討を行った。

B. 方法

1. Hb小胞体、Hb溶液

Hb小胞体(HbV, Oxy体; [Hb] = 10 g/dLをリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4)で希釈し、0.02 g/dLとした([heme] = 12.4 μM)。また精製ヒトHb溶液(CO体, 40 g/dL)をPBSで希釈して0.02 g/dLとし、酸素ガス気流下、可視光照射によってHbO₂体とした。それぞれ5 mLを石英製二面キュベット(光路長: 1 cm)に入れ、ゴムキャップで密栓した。

2. 紫外可視吸収スペクトル測定

測定装置は、日本分光社製JASCO V-650を用い、積分球装置(ISN-470)を取り付けて測定した。酸素が結合したOxy体の測定、また窒素ガス通気を約5分間行い、酸素を完全に除去し、deoxy体の測定を行なった。

C. 結果および考察

積分球を使用していない条件で測定したHbVのスペクトルは、短波長側ほど吸光度が高く、300 nm付近ではSoret帯の吸高度を上回った(Figure 1)。これはHbV粒子による光散乱の影響である。積分球を使用することにより、その影響は大幅に低減

され、スペクトルはかなりHb溶液に近づいたが、完全には一致していない。これはキュベットの光路長が1 cmと長いため、積分球が隣接しているにもかかわらず、散乱光を完全には集光できていないことによる。最大吸収波長(λ_{max})を比較したところ(Table 1)、HbVのSoret帯の λ_{max} 値には若干(~3 nm)の赤方シフトが見られた。これは光散乱によりベースラインが高くなり、特に短波長側でピーク位置にずれが生じたためと考えられる。Q帯 λ_{max} 値の差は、半値幅が広く、モル吸光係数が小さいピーク形状に基づく誤差と言ってよい。Deoxy-HbVのQ帯は明確でなく、ショルダーとして認められるに過ぎなかったが、積分球を使用することにより、 λ_{max} 550 nmにピークが検出され、Hb溶液のスペクトルに近いものとなった。

Table 1. HbVおよびHb溶液の λ_{max}

試料	λ_{max} (nm)
O ₂ -HbV	418, 540, 576
O ₂ -HbV(積分球)	417, 542, 576
O ₂ -Hb溶液	415, 541, 576
O ₂ -Hb溶液(文献値)*	415, 541, 576
Deoxy-HbV	432, (shoulder)
Deoxy-HbV(積分球)	430, 551
Deoxy-Hb溶液	430, 554
Deoxy-Hb溶液(文献値)*	430, 555

*E.E. Di Iorio, *Methods Enzymol.* 76, 57-87 (1981).

今回の実験は、キュベットを用いた通常の分光測定における検討であったが、光散乱の影響は、①特に短波長域で顕著であること、②積分球の利用によりこれを低減できることが明確となった。パルスオキシメータは、拍動のある末梢血管、つまり細動脈での酸素飽和度を計測する装置であり、透過性の高い近赤外領域のレーザーを利用してい

る。多波長計測にはより短波長のレーザーが必要で、その場合には積分球式反射型パルスオキシメータの活用が有効であると期待される。

2. 出血性ショック蘇生における再灌流障害の軽減に関する検討

A. 研究目的

出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流を伴う。虚血状態では細胞内ATPが代謝されヒポキサンチンとなり、これが組織内に高濃度で蓄積する。また、マクロファージが活性化されて炎症性サイトカインを産生し、これに応答して好中球などが遊走される。各種接着因子も誘導され、好中球は血管内皮細胞に接着、血管外組織にまで浸潤する。このような状態で再灌流により酸素が供給されると、まずキサンチンオキシダーゼの作用により活性酸素が発生する。さらに、好中球細胞膜にあるNADPH-オキシダーゼも大量の活性酸素を産生する。従って、急激な酸素供給は再灌流傷害を助長する可能性がある。通常の医療処置では、まず生理食塩水やリンゲル液などの晶質液を投与し、その後コロイドの投与や輸血へと移行する。また、外傷部位の止血が施される前に血圧を正常値に戻すと出血が促進され、却って死亡率を増大させることがあるので、血圧を低く保つHypotonic resuscitationが行われる。つまり、人工赤血球(酸素運搬体)を用いる出血性ショックからの蘇生については、単なる酸素供給の観点のみならず、後続する障害についても充分考慮した対応が求められる。内因性のCOが情報伝達分子として極めて重要な役割を果たすことも明らかにされているが、COの抗炎症作用も興味深い。実際にCOを結合したHb小胞体(CO-HbV)を出血性ショック状態のラットに投与すると、蘇生6時間後に細胞保護効果

が得られることを見出している。そこで本研究では、同一実験モデルを用い、酸素輸液のみならず晶質液を投与し、6時間後の肝機能パラメータを評価した。

B. 研究方法

1. 蘇生液

蘇生液としては、生理食塩水(大塚製薬製、Saline)、リコンビナントアルブミン溶液(5wt%, rHSA)、Hb小胞体をrHSAに分散させたもの(HbV/rHSA, [Hb]=10g/dL)、脱血液(SAB)、洗浄したラット赤血球をrHSAに再分散させたもの(wRBC/rHSA)、一酸化炭素(CO)を結合したHbV(HbV-CO/rHSA)およびwRBC(wRBC-CO/rHSA)、またHbを内包しない空の小胞体をrHSAに分散させたもの(EV/rHSA)とした。Saline群については、脱血量の2~3倍量を投与した。その他については、脱血量と同量を投与した。wRBCの調製にあたっては、採血から投与試験に用いるまでの所要時間は、3時間以内とした。

2. 出血性ショック蘇生試験

実験法は既報(Sakai et al., *Crit. Care Med.* 33, 806-12 (2004))に従った。Wistar rat(約250g, ♂)にsevoflurane(1.5%)を吸入させ麻酔状態とし、自発呼吸を維持した。頸動脈、頸静脈にカテーテルを留置した。ラットの全血液量を56 mL/kgと仮定し、28 mL/kg(約8.4 mL/匹)を1 mL/minの速度で頸動脈より脱血した。脱血後15分間放置してから試料を頸静脈から投与した[rHSA (n=4)、EV/rHSA (n=7)、HbV/rHSA (n=7)、HbV-CO/rHSA (n=9)、wRBC/rHSA (n=9)、SAB (n=7)、saline (n=7)、wRBC-CO/rHSA (n=9)]。投与後6時間まで血行動態、血液ガス組成を観察。測定ポイントは、脱血前、脱血後、投与直後、0.5、1、3、6時間後とした。計測終了後直ちに開腹し下大静脈から血液6 mLを採取、採血管に取り遠心分離または超遠心分離により透明血漿を得て、血液生化学的検査を実施した(BML

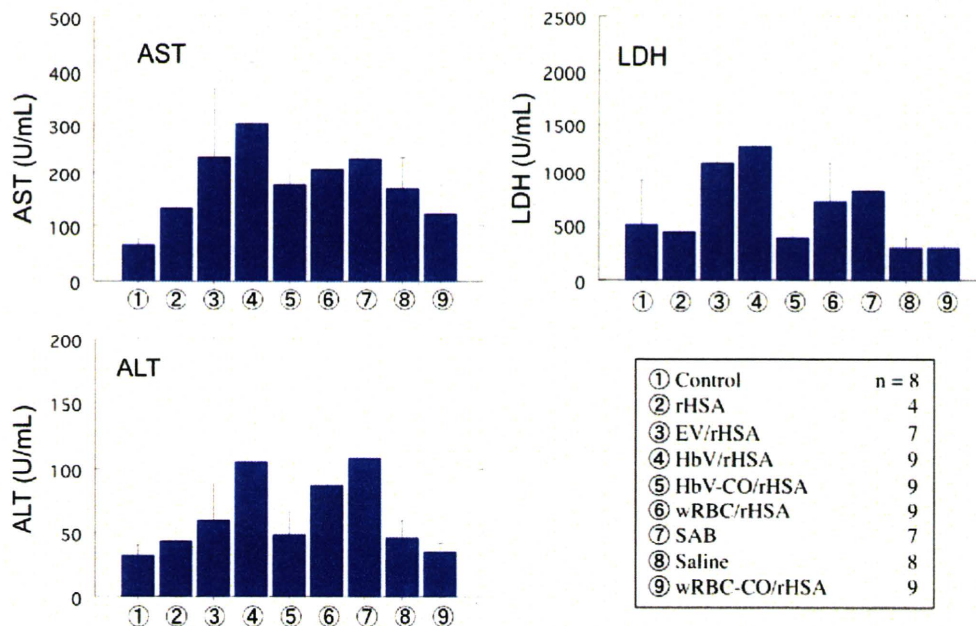


Figure 2. Plasma enzyme levels (AST, ALT, and LDH) 6 hr after resuscitation. Mean±SD.

社依頼)。本研究では、肝機能の反映項目としてALT、AST、LDHについて注目した。

C. 結果

血圧、血液ガス組成については、酸素を運搬するHbV/rHSA、wRBC/rHSA、SAB群、またCOを結合したHbV-CO/rHSA、wRBC-CO/rHSA群はともに同等の推移を示した。平均血圧は脱血前には約100 mmHgであったが、脱血後には約30 mmHgまで低下した。投与直後には85~90 mmHgに回復、その後6時間は80 mmHg付近を推移した。血液ガス組成については、脱血後に代償機能によるPaO₂の上昇、PaCO₂の低下、またpHの低下と乳酸値の上昇が見られた。蘇生液の投与直後に、両群ともPaO₂、PaCO₂が初期値にまで回復した。pHは投与直後に最低値を示した。また乳酸値も投与直後の回復はなかったが、1時間後には初期値に回復し、6時間後まで推移した。pH、乳酸値の回復の遅れは、投与直後に末梢微小循環が回復に向い、蓄積していた代謝産物がwash outされたために見られる現象と判定した。rHSA群では死亡例があった。EV/rHSA群は全例が生存し、蘇生直後に血圧が脱血前値にまで回復したが、3時間後には低下し始めた。Saline群

では全例が生存したが、血圧は低い値を推移し、6時間後でも約60 mmHgであった。血行動態と血液ガス組成を見る限りにおいては、酸素運搬機能を有する蘇生液あるいはそのCO結合体が回復を早め、6時間安定に推移した。

6時間経過後の血中AST、ALT、LDH値をFigure 2に示す。酸素運搬機能を有する蘇生液の投与により、これら酵素濃度は増大したが、酸素運搬機能を持たない蘇生液、ならびにCO結合体の投与では、酵素濃度は比較的低い値となった。

D. 考察

出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流を意味し、活性酸素の産生による様々な障害、いわゆる虚血再灌流障害、さらには多臓器不全に繋がる可能性がある。一般的に虚血状態では細胞内ATPが代謝されてヒポキサンチンとなり、これが組織内に高濃度で蓄積する。再灌流により酸素が供給されると、キサンチンオキシダーゼの作用により活性酸素(スーパーオキシド)が多量に発生する。また、マクロファージが活性化されて炎症性サイトカインを産生し、これに反応して好中球などが遊走される。各種接着因子も誘導され、好中球は血管内皮細胞に接着し、さらに血管外組織

にまで浸潤する。このような状況下で急激に酸素が供給されると、好中球細胞膜にあるNADPH-オキシダーゼが大量の活性酸素を産生する。つまり出血性ショックに対する輸血は、初期の状態においては生体に対し酸素を過剰に供給して活性酸素の産生を促し、虚血再灌流障害を助長させる可能性があるのである。今回観測された血中酵素濃度(AST、ALT、LDH)の増大は、この虚血再灌流傷害が一因と推察される。従って、蘇生の初期には酸素の供給を制限することが理想的なのかもしれない。

Salineの投与では、血圧や血液ガスの回復は遅れるものの、血中酵素濃度は低い傾向にあった。このようにSaline投与による蘇生は、初期段階における虚血再灌流障害を抑えるが、その後輸血あるいは酸素運搬体の投与により血行動態を回復させる必要がある。

CO結合体投与では、蘇生初期における酸素供給はないが、血液循環量は直ちに回復し、血液粘弾性も維持されていた。面白いことにCO放出に伴い、徐々に酸素供給量が回復する。さらにCOの放出により血管拡張効果も期待できる。その機序としては、① COが血管壁平滑筋にあるグアニル酸シクラーゼ(GC)に直接結合して血管を拡張し、末梢血流を改善する、② また正常組織では血管弛緩因子であるNOがミオグロビン(Mb)と反応し失活する経路が存在するが、このとき投与したCOがMbに結合することにより、NOの失活が抑制される。GCに対する作用はCOよりもNOの方が数千倍強く、血管拡張により末梢血流を改善する。そして、末梢血流の改善は、代謝産物の除去と酸素供給を促進することになる。

NADPH-オキシダーゼはヘム蛋白質なので、これにCOが結合することにより活性酸素の産生量が低減する説、また炎症反応で誘導されるiNOSもヘム蛋白質なので、過剰量のNO産生を抑制しているという説もある。一般的にASTは心筋、肝、脳に高濃度に存在し、ついで骨格筋、腎などに多く含まれ

る。また、ALTは肝臓に最も多く分布し、以下は腎、心筋、骨格筋の順番である。臨床的には、AST、ALTの上昇は主に肝疾患の時に見られる。AST値およびALT値が顕著に増大したことから、出血性ショックによる虚血と酸素を結合したHbV、RBCの投与による再灌流の結果、肝臓で虚血再灌流障害が生じたものと考えられる。一方、COを結合したHbV、RBCの投与ではこれが低減されていた。

E. 結論

出血性ショック蘇生液としてHb小胞体を投与する際は、虚血再灌流障害を低減させることを考慮する必要がある。酸素を結合したHb小胞体を使用する場合には、先ず晶質液を投与してから経過を見ながら投与することが好ましい。また、COを結合したHb小胞体は、初期段階で投与しても再灌流障害を惹起することなく、徐々に酸素運搬機能を回復させるので、理想的な蘇生液といえる。

④

A. 研究目的

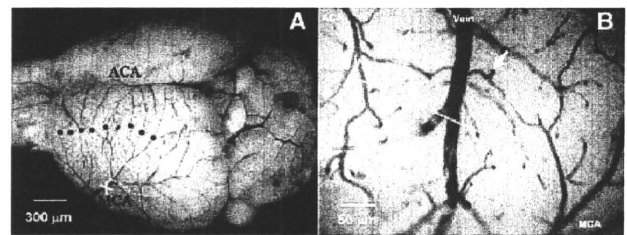
脳梗塞時、微小循環の維持は患者の予後を左右する。中大脳動脈(middle cerebral artery; MCA)梗塞時、前大脳動脈(anterior cerebral artery; ACA)から血液が供給されると思われるが、その動態については不明な点が多い。本研究では、MCAとACA間に形成される細動脈吻合(arteriolo-arteriolar anastomose; AAA)の挙動と血流動態、血管新生の様子を検討することによって微小循環動態を明らかにすることを目的とした。また、その際の人工赤血球の投与による影響を検討した。さらに、これまでラットにおいて確立してきた高速度カメラ共焦点レーザー顕微鏡およびKEIO-IS2を用いた赤血球速度測定法をマウスにも応用するため、ラットと同様にマウスの赤血球速度を測定して、種差があるか否かを検討した。

B. 研究方法

C57BL/6J マウス(8-12 週齢、体重 22-25g、n=16)を用い、イソフルレン麻酔下で頭部を定位固定装置に固定し、左頭頂側頭葉に硬膜温存下で頭窓を作成した。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観察した。また、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ーした。左中大脳動脈起始部を電気凝固(田村の変法)にて完全閉塞モデルを作成し(Tran Dinh A, Kubis N, Tomita Y, Karaszewski B, et al. *Neuro Image*. 31: 958-968, 2006. Kubis N, Tomita Y, Planat V, Tran Dinh A, et al. *Neuro Image*. 34: 1-11, 2007.)、脳皮質の約 50 μm の深さにおける関心領域(ROI)の FITC ラベル赤血球の挙動をビデオカメラ(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.)。その後、再び麻酔して同部位における血流動態および血管新生の様子を 7 日まで観察した。MCAO 直後に人工赤血球を投与した場合の脳表の変化は、既に報告したように観察・記録した。また、21 匹の C57BL/6J マウス(8-12 週齢、体重 22-25g)において高速度カメラ共焦点レーザー顕微鏡にて記録した画像から単一毛細血管内を流れる赤血球速度を KEIO-IS2 を用いて計測し、ラットと比較した。

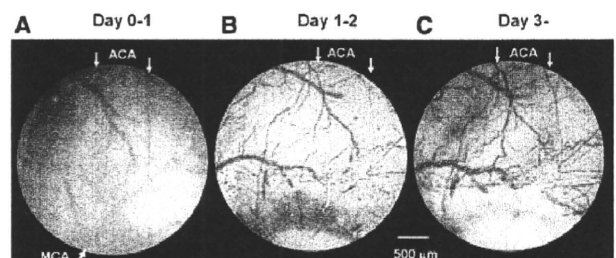
C. 結果および考察

AAA 部位にて、逆流する血流を観察した。FITC 蛍光赤血球は MCA と ACA の両方向から流入し、その相対する血流は T-結合部にて合流していた。その合流した血流は穿通動脈の中に流入していた。二重に栄養されている T-結合部の位置は固定されておらず、血行動態の変化に合わせて、隣の T-結合部へと機能が移動していた(図 1)。



(図 1) A. カーボンブラックを含む Mercox を全身血管内に注入後に摘出したマウス脳における外側皮質動脈の背側図。黒点は、ACA と MCA との間の AAA を示している。白い X 印は MCAO の場所を示している。白い丸は頭窓の位置を、点線はおおよその虚血中心部の位置をそれぞれ示している。B: 生体脳における AAA が白線によって示されている。一本の大きな皮質静脈がその中心を横切っている。AAA の中では、矢印によって示された 3 つの T-結合部が認められた。小さい矢印は、対面する血流の方向を示している。

MCAO によって、MCA 側からの赤血球の血流がただちに停止した。一瞬の“時間の遅れ”の後で、血液は、MCA 分枝から MCA 本幹に向けて逆行性に流れ始めた。その逆行性の血流は、統計学的に有意な現象であった ($p < 0.05$)。これは、一瞬の時間の遅れの後で、MCA の他の枝へ血液を供給する役割を果たしていた。毛細血管においては、MCAO により脳虚血中心部において赤血球の即時の消失をもたらし、AAA 近くの辺縁領域においてもその程度は軽いが赤血球の消失をもたらした。脳虚血 3 日後には、AAA を中心とした血管新生を伴うリモデリングが始まる様子が確認された(図 2)。



(図 2) MCA 後の ROI 内の血管構造の変化。A: Day 0-1。MCA が栄養する小血管および毛細血管は、不明瞭となり、血管構造の破壊を伴った。脳虚血中心部(底部)は、まるで暗いカ-テンに覆われているかのように見えた。矢印は、ACA と MCA の末梢の枝を示している。B: Day 1-2。カ-