

ンパク溶液と考えることができる。しかし、献血血液を原料としていることから、遡及調査の必要性について以前より考慮しており、供給を受けたのちに輸血製剤のラベルに記載されている番号シールを利用してヘモグロビン溶液がどの血液製剤より生成されたかを記録してきた。ゆえに遡及調査の基礎となる条件はすでに整っている。この記録を利用して、原料となる血液製剤のサンプルの長期保存、製造したヘモグロビン溶液の長期保存、製剤製造時のウィルス検証結果などの体制を整えることで遡及調査は可能となると考えられた。

b. 現在まで行われた試験リストとその成績をまとめた結果は現在までの厚労科研の成果と一致しており、下記に記した。これらの結果は非GLP下で検討したものである。現在まで多くの動物種を用いてその安全性、有効性、酸素治療薬としての可能性について検討しており、計画中の人への投与の安全性を類推できると考えられた。

c. Hb小胞体の構成成分（Hb溶液および4種類の脂質成分）を成分ごとに安全性評価を行わず、最終製剤の安全性をもって安全性試験を行うことについて検討した。精製ヘモグロビンをそのまま投与すると、比較的速やかに尿中に排泄されることが判明している。また、Hbが大量に血液中に流出する状況（急性の大量の溶血、外傷による筋肉損傷など）では腎障害や血管収縮による臓器障害・機能不全を惹起することが知られており、Hb溶液をそのまま人に投与して安全性を検証することは意味がないと結論した。脂質4成分についても同様のことが言える。脂質を大量に血中に投与すること自体が危険なことから考えられ、リポソームとして存在することにより循環血液中で機能を発揮する機能粒子であることを現在まで動物への投与により証明してきた。

さらに、リポソームの形で投与することによりヘモグロビンも脂質成分も正常な代謝経路に乗って代謝され、肝、腎、細網内皮系などの代謝系にも大きな負荷をかけないことを明らかにしてきた。

以上からHb小胞体の安全性評価はこの製剤そのものを使用した動物実験が妥当と結論した。

d. 製剤の規格、特に無菌性の確立についてHb小胞体の製造をGMP規格に乗せることを常に意識して開発を行ってきたが、解決すべき問題として最終製剤の無菌性の保証が問題となっていた。Hb小胞体の直径は250nmであり、最終製剤に無菌濾過フィルターを用いた無菌化は不可能であることが問題であった。本研究班での検討でも最終製剤の無菌化について検討を行い、製剤となった段階から無菌化することは困難で、最終工程に入る前に無菌性の担保された原料を用いて無菌製造ラインを作成することが重要な課題であることが明らかとなった。

また、最終製剤が無菌状態であることを検証するプロセスも新たに開発する必要があり、現在その方法を検討中である。

D. 考察

Hb小胞体は動物試験では血液代替、酸素治療の双方で良好な成績を収めており、臨床応用は目前と考えられているにもかかわらず、臨床応用が足踏みをしている状況が続いている。このような状況を打破するためにPMDAにおける指導を受けつつHb小胞体の臨床応用を促進する戦略薬事相談の手法をとることとなった。戦略薬事相談は今年度から開始された新薬あるいは新薬の可能性のあるシーズの開発研究を行う研究者と企業とを結びつけ、速やかに臨床治験を行えるようアドバイスをを行うシステムであり、Hb小胞体の臨床応用の問題点を明らかにし、今後のロードマップを明らかにすることが可能と考えられた。

事前面談で明らかになった問題点は多岐にわたったが、製剤が特定生物由来製剤として審査、承認が行われるとの考え方が示され、通常の薬剤の開発よりもハードルが高くなった。また、GMP工程の検証では規格の決定について、無菌製造プロセスの確立の困難さが浮き彫りにされたことは

この工程の解決により多くの力を注がなければならぬことが示された。また、安全性試験については現在にないカテゴリーの薬剤として評価していただかなければならないことが明らかとなった。このような結果をもって対面助言を受ける予定にしていたが、無菌プロセスの確立と無菌性の評価、安全性試験についての考察に加え、製造コストの問題とHbの歩留まりなどの問題も浮上し、現在戦略薬事相談のプロセスが停止している。

今後、企業と交渉を重ねつつ、PMDAの対面助言を得て治験へ進む体制を整えることが必要と考えられた。

E. 結論

Hb小胞体の臨床応用を目指してPMDAにおける戦略薬事相談を利用して臨床応用を促進する方針とした。3回の事前相談を経てHb小胞体を臨床応用するうえでの問題点を洗い出し、対面助言へ向けて鋭意準備を進めているが、諸事情により、戦略薬事相談の進行が停止している。今後、企業と交渉を重ねつつ治験へ進む体制を整えることが必要と考えられた。

5. 持続出血による出血性ショックに対するヘモグロビン小胞体輸注の有効性についての検討

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、 $358 \pm 25\text{g}$) 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。カテーテルを留置後、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($\text{BW}(\text{g}) \times 5.6\%(\text{ml})$)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(ドナー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%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。

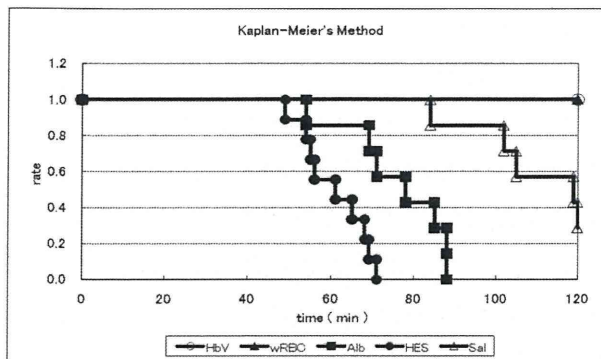
倫理的配慮: 実験プロトコールは慶應義塾大学医学部実験動物センターおよび動物実験委員会の承認を得て行なわれ、実験動物に関しては、十分な麻酔下にて実験を試行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

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 $37 \pm 7.9\text{mmHg}$ 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。

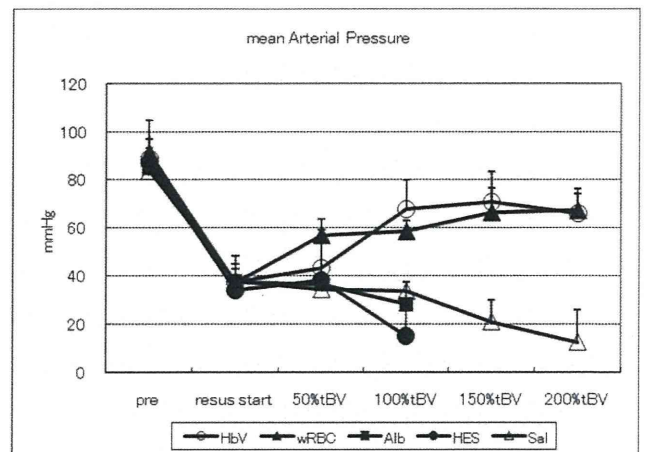


洗浄赤血球および HbV の酸素運搬を有する蘇生液での生存率が優れており、他の群間との間に有意差があった(Log rank test)。生理食塩水投与群では蘇生後 90 分を超えて生存する例が多かったが、120 分経過時の生存率は 29%であり後述する pH、乳酸レベルから、組織・臓器循環には大きな障害が起きていることがうかがえた。

2. 平均血圧の変動

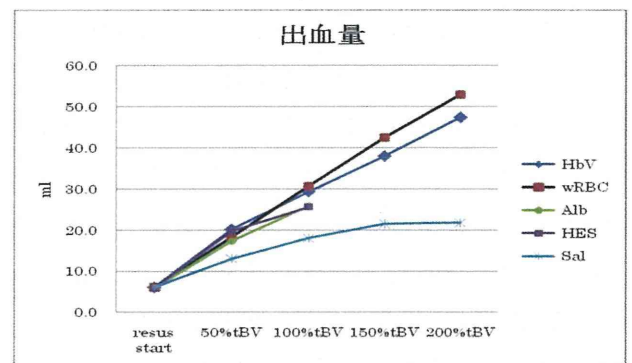
出血のスピードは 0.6~3ml/min(中央値 1.7ml/Min)であり、50kg のヒトに換算すると 100~500ml/min(250ml/min)という大量出血の状態であった。血圧は速やかに低下し、出血性ショックの状態に陥った。(図 2)

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 群とアルブミン生食群は死亡する動物が増加し、循環血液量の 150%の出血が認められる状況ではアルブミン生食群、HES 群に生存する動物はなく、生食群の一部と wRBC 群、HbV 群の全動物が検討の対象となった。HbV 群、wRBC 群では血圧は保たれ、生食群との間に有意差を認めた。



3. 出血量

使用した動物の推定循環血液量は 20ml 前後であり、循環血液量の 30%は 6.2~7.7ml にあたる。循環血液量の 30%を喪失した時点で蘇生を開始し、循環血液量の 200%の蘇生液を量を 56ml/kg/min のスピードで輸注した。それぞれの動物で循環血液量の 50%を輸注した時点、100%を輸注した時点、150%を輸注した時点、200%を輸注した時点として採血、呼吸循環諸標を計測した。

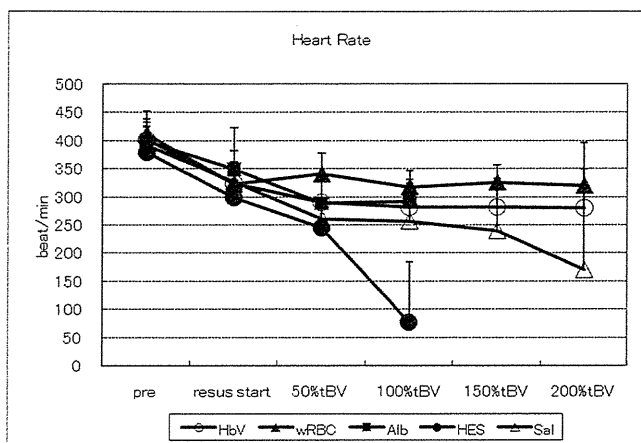


出血は平均動脈圧に応じて増減し、アルブミン生食群、HES 群、wRBC 群、HbV 群で蘇生後も蘇生後と同様の速度で出血が持続した。生食群では平均血圧の低下に伴い、出血量が減少し、wRBC 群、HbV 群との間に有意差が認められた

4. 心拍数

実験開始時と比し、蘇生開始時にはいずれの群でも心拍数は減少していた。蘇生開始後 wRBC 群は蘇生開始時の心拍数を維持していた。HbV

群では 50%BV の蘇生液を注入した時点より心拍数は変化を認めなくなった。アルブミン生食群、HES 群は蘇生開始後心拍数の低下を認め、100% BV 量の蘇生液を輸注終了前後ですべての動物が死亡した。輸注量は出血量に及ばず、Hypovolemia と Hypoxia による臓器不全が心停止の原因と考えられた。生食群では蘇生後血圧が低い値で保たれ、出血量が抑えられたこともあり、血圧の低い状態で維持されたが、100%BV 量の生食を輸注した後より、心拍数の減少が認められ、200%BV 輸注時には wRBC 群、HbV 群との間に有意差を認めた。

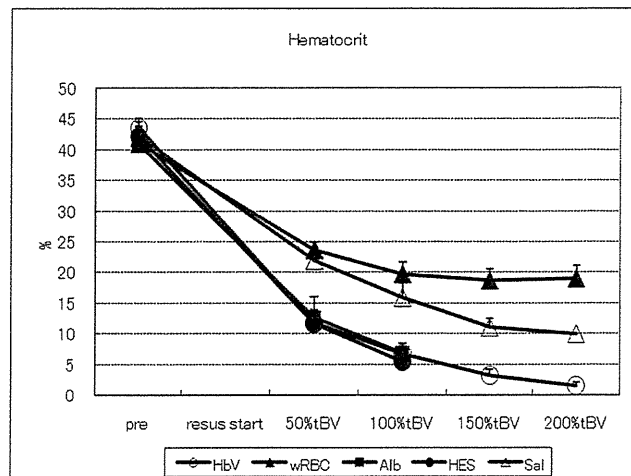


5. ヘマトクリット

蘇生液開始とともにヘマトクリットも低下を示した。wRBC 群でも 100%BV 量の輸注が終了するまでは徐々に低下し、その後は 20%を維持した。これは投与した wRBC 浮遊液のヘマトクリットとほぼ同じ値であり、輸血と出血がバランスした状況であったと考えられた。

一方、生食群では血圧が低下し、出血量が減少したためか、ヘマトクリットの低下は緩やかであった。生食群に比して膠質浸透圧を有するアルブミン生食群や HES 群では出血のスピードはそれほど低下せず、血圧、心拍数が減少した。出血のスピードが衰えなかったため、ヘマトクリットは急速に減少した。膠質浸透圧を保った溶液では、循環血漿量が確保されたためか、出血が減少せず、急速に状態が悪化した。生食群では輸液した量の

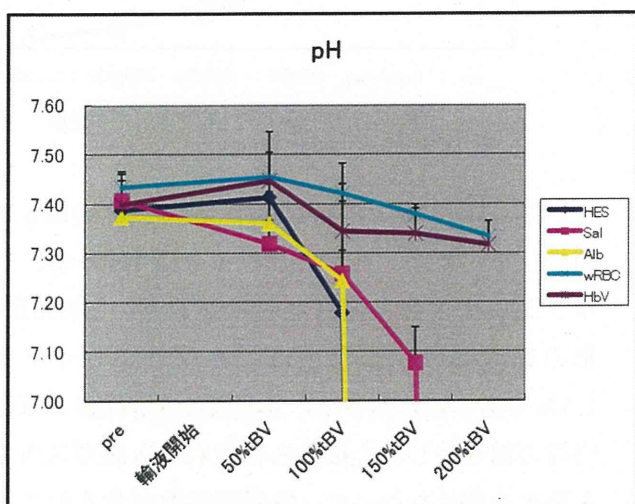
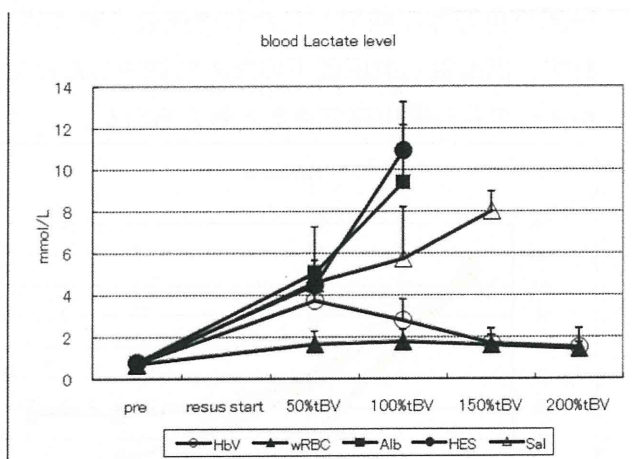
一部が血管外に漏出したため血圧の上昇が得られず、出血量も血圧低下のために減少したため、かえって長時間生存できたと考えられた。



一方、HbV 群では出血量が wRBC 群に比して減少していたが、ヘマトクリットは HES 群、アルブミン生食群と同様な現象を見せ、200%BV 量の輸注が終了した後はヘマトクリットは 1.5%であった。しかし、血圧は wRBC 群とほぼ同等の値を呈し、心拍数も保たれ、血液ガス所見も悪化を認めなかった。酸素運搬体が含まれていることが生存に重要であることがこのモデルから明らかとなった。

6. 乳酸値および pH

乳酸値は wRBC 群では経時的に維持されていた。アルブミン生食群、HES 群では出血の増加及び輸注量の増加とともに増加し、100%BV 量の輸液を行った時点で 9mmol/L を超え、全例死亡するにいたった。生食群でも徐々に乳酸レベルは上昇し、150%BV 量の輸液が終了した時点で 8mmol/L を超えた。HbV 群では 50%BV 量の輸液まではアルブミン生食、HES 群と同様に上昇を認めたが、その後低下し、200%BV 量の輸液が終了した時点では wRBC 群と同様に正常範囲内であった。



pH は乳酸の増加と反比例するような変化を示し、アルブミン生食群、HES 群では 100%BV 量の輸液が終了する時点で 7.3 以下となった。生食群でも低下は顕著で、150%BV 量の輸液が終了した時点では 7.08 と著しい acidosis を示した。一方、wRBC 群、HbV 群でも、pH は緩やかに低下し、200%BV 量の輸液が終了した時点での血漿 pH はそれぞれ 7.33 ± 0.03 、 7.32 ± 0.05 であった。このアシドーシスは出血性ショックによる臓器・組織の嫌気解糖によるものと考えられ、酸素運搬体を有する蘇生液の投与により出血が持続していても組織の酸素代謝が保たれることを示したと考えられた。

D. 結論

持続出血モデルは実際の外傷においてよく遭遇する病態で、医療施設までの管理の違いによって救命率が異なると報告されており、生食の大

量輸液のみでは救命率が改善しないあるいは低下するとされている。

今回我々は膠質浸透圧を有する輸液、生食、酸素運搬体として赤血球と HbV を含む蘇生液を使用して持続出血による出血性ショックモデルの治療経過を観察した。膠質浸透圧を有する輸液では血管内での容量に変化がないため、出血量が多くなり、早期に嫌気解糖が進み、重度のアシドーシスに陥り死亡すると考えられた。一方、生食による蘇生では輸液量の一部が血管外に漏出するためか、出血量が減少し、血圧は低いものの、循環だけが保たれたものと考えられた。臓器・組織の嫌気代謝は亢進し、極端なアシドーシスを呈して死亡したと考えられた。一方、酸素運搬体を有する輸液では膠質浸透圧を有する輸液に酸素運搬体(赤血球あるいは HbV)を分散させた。出血は持続したが、血圧は低いレベルで安定し、輸液中の pH、乳酸レベルは正常範囲内で保たれていた。また、この酸素運搬体を含む輸液群のみが 120 分まで全例生存した。

以上より、持続出血症例に対し、HbV を含む輸液は赤血球浮遊液と同様、臓器・組織の酸素代謝を維持し、生存率を改善することが明らかとなり、臨床において外傷受傷直後よりの初期輸液として適している可能性が示唆された。

6. 持続出血モデルに対するヘモグロビン小胞体低速輸注の有効性および止血後生存の検討

A. 研究目的

外傷に対して輸液、輸血を用いてどのように治療するかについてはある程度のコンセンサスが得られており、外傷現場において輸液ルートを確認して輸液を行い、救急医療施設へ搬送することが通常行われている。しかし、通常の血漿代用剤を用いて輸血による血圧維持を長時間行った場合、出血量の増加及び過度の血液希釈状態に至り、却って生存率を低下させる原因となることが予想される。昨年度の研究では、人工赤血球を含む輸液剤の適用によって、制御不能出血時に大量輸液を行った動物モデルで2時間の生存が可能で、通常の血漿代用剤と比較して有意に生存性が向上していた。一方、蘇生には大量の人工血液を必要とすることが明らかとなった他、止血に成功した後の生命維持方法については不明であった。速やかに輸血療法へ移行することが望ましいが、大規模災害時の対応などでは、常時最良の治療環境を提供することは困難である為、一定期間は人工赤血球による生命維持が必須となる。そこで、輸液条件を改良し、人工赤血球の使用量を抑制するとともに、止血後の処置について検討することを目的とした。

制御不能出血のモデルとしては昨年確立した尾動脈継続出血モデルを用いた。

B. 研究方法

1. 試験系およびセッティング

雄性Wistarラット(9週齢、304-342g)を用いた。セボフルレンの吸入麻酔を行い、ラットを仰臥位に固定した。なお、体温制御は行わなかった。ラットは挿管せずに自発呼吸下に吸入麻酔を行い、蘇生実験を、さらに蘇生完了後は覚醒させ、無拘束下にて遂行した。持続出血経路として尾動脈に24G留置針(SR-FS2419, Terumo, Tokyo, Japan)を刺入して確保した。頸部を露出、

SP45(Polyethylene tube, I.D. 0.58mm, O.D. 0.96mm, 夏目製作所, Tokyo, Japan)を用いて右頸動脈に動脈圧測定ライン、左大腿静脈に静脈注入ライン(1)を留置した。さらにSP31(I.D. 0.5mm, O.D. 0.8mm)を用いて左大腿動脈に動脈血採取ラインを設置した。尚、これら3本のラインは皮下を通して頸背部より体外へ配し、動脈圧ラインを圧トランスデューサー(TP-440T, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)に、静脈注入ラインをインフュージョンポンプ(TE-311, Terumo, Tokyo, Japan)に接続した。また、尾静脈に24G留置針を刺入して静脈注入ライン(2)を確保しインフュージョンポンプ(Pump11, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA)に接続した。その他、心電図計測用に四肢へ電極を、末梢組織酸素分圧測定用に腹部皮下へ酸素電極(POE-10N, Bio Research Center, Tokyo, Japan / PO2-100, Inter Medical, Aichi, Japan)を、末梢血流測定用に右下腹部皮膚へ血流測定プローブ(Omegaflo, FLO-C1, Omegawave, Tokyo, Japan)を設置した。各測定装置はPolygraph system(PEG-1000, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)に接続し、連続して観測した。

2. 群構成

動物を2群に分けた。すなわち①同種血洗浄赤血球の生理食塩液分散液(wRBC/Sal)群および②人工赤血球の生理食塩液分散液(HbV/Sal)群とした。尚、wRBC/Sal液のヘモグロビン濃度はHbV/Sal液と同等の $10 \pm 1 \text{g/dL}$ に調製した。

3. 尾動脈持続出血モデル

昨年開発した方法を基に50IU/bodyのヘパリンを静脈注入ライン(2)より投与し、全身の凝固防止を行った。持続出血経路として尾動脈に確保した24G留置針から放血させ、持続出血を開始した。出血量が循環血液量の30%に到達した時点から、静脈ライン(1)より6%ヒドロキシエチルデンプン70000

(HES, Salinhes, Fresenius Kabi Japan, Tokyo, Japan) を速度28mL/kg/hrにて注入し蘇生を開始した。注入量が循環血液量の50%に達した時点でHES注入速度を14mL/kg/hrへ変更し、静脈注入ライン(2)より酸素運搬体としてwRBC/Sal液またはHbV/Sal液を速度14mL/kg/hrで注入した。総注入量が循環血液量の200%に達した時点(およそ4時間後)で尾動脈出血を停止した一方で、総出血量から総注入量を減じて算出した循環不足量を充足するまで、そのままHES及び酸素運搬体の注入を継続した。循環量補充が完了した後、静脈注入ライン(2)を除去し、麻酔から離脱させた。続いて補液として静脈注入ライン(1)よりwRBC/Sal群に対してHESと生理食塩液の等量混合液を、HbV/Sal群に対してHESとHbV/Sal液の等量混合液を速度5mL/kg/hrで点滴注入した。この点滴は蘇生開始から24時間まで継続した。

4. 観察測定

測定項目は生存時間、出血量推移、平均動脈血圧、心拍数、呼吸数、末梢組織酸素分圧、末梢血流量とした。また、出血前、蘇生液50%注入、100%注入、150%注入、200%注入、循環不足量充足後、覚醒後2時間、覚醒後10時間、蘇生開始後24時間に採血を行い、ヘマトクリット測定及び血液ガス分析 (ABL725, Radiometer Medical A/S, Copenhagen, Denmark) を行った。蘇生開始後24時間以上生存した個体は、ジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈採血を行い、放血犠牲死させた後、肉眼的に内部を観察して主要臓器の一部を採取した。採取した血液は血漿を凍結、組織を中性リン酸緩衝ホルマリンで固定し保存した。

C. 結果および考察

1. 生存率 (Fig. 1)

wRBC/Sal群は蘇生後24時間での死亡例は無く、累積生存率は100%であった。一方、HbV/Sal群では1例が覚醒下での点滴補液中に死亡し、累積生存

率は83.3%であった。Log rank test による生存分析では両群に差は認められなかった ($p=0.3173$)。

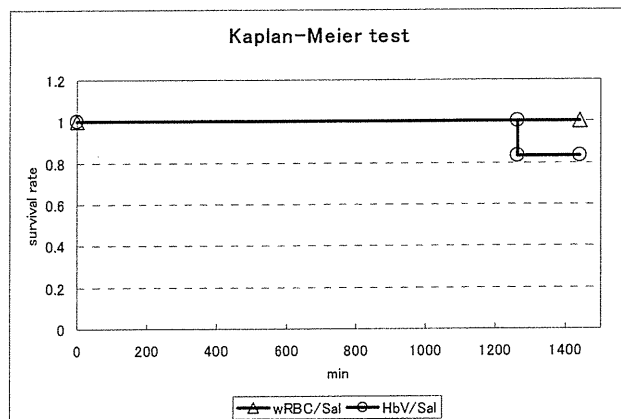


Fig. 1 Survival rate (Kaplan-Meier test), no significant difference ($P<0.05$)

2. 出血量、循環量増減、ヘマトクリット (Fig. 2 Fig. 3 Fig. 4)

a. 出血量

両群ともほぼ同等の推移を示した。循環量の75%注入時点まではほぼ直線的な増加を示したが、以降は若干緩やかな増加へ転じた。

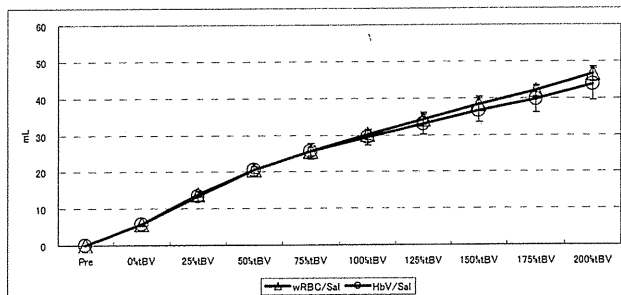


Fig. 2 Hemorrhage volume, no significant difference ($P<0.05$)

b. 循環量増減

各時点での出血量から注入量を減じ、凡その循環量変動を算出した。全体に注入量が出血量を上回ることは無く、止血後に充足するまで循環量不足状態が続いた。75%注入時点までは両群とも同等の推移を示したが、100%から200%注入まではHbV/Sal群が若干の出血抑制傾向を示した ($p=0.07431\sim0.4352$)。

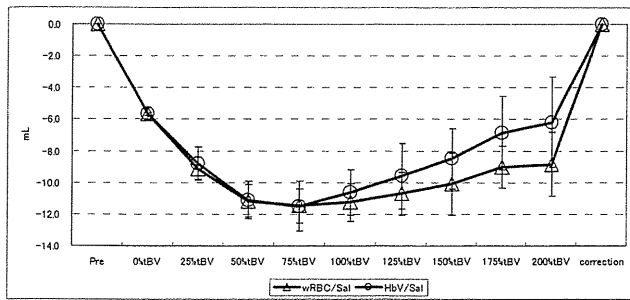


Fig. 3 Change of Circulation Volume, no significant difference ($P < 0.05$)

c. ヘマトクリット

両群とも50%注入（HESのみ）時点ではHtは10%弱であった。HbV/Sal群では注入量の増加に従って低下を示し、充足完了時点でHt=1.0±0.0%まで低下した。その後、蘇生後24時間までは1.0から1.8%程度の著しい低値で推移した。一方、wRBC/Sal群では赤血球の補充により、充足完了時点でHt=20.0±1.5%まで増加した。点滴補液中では、覚醒後2時間の時点でHt=24.0±3.5%まで上昇し、一時的な血漿成分の血管外漏出がみとめられた。その後、蘇生後24時間では17.0±2.2%まで低下し、循環量の維持が確認された。

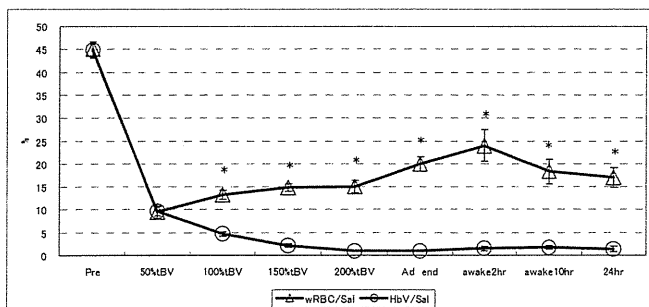


Fig. 4 Hematocrit, *: significant difference ($P < 0.05$)

3. 血圧、心拍数、呼吸数 (Fig. 5 Fig. 6 Fig. 7)

a. 血圧

循環血液量の30%相当におよぶ出血によって、両群とも平均血圧が40mmHg以下に低下した。出血が継続しているにも拘らず、蘇生開始によって低下は抑制され、75%量注入時点からは上昇傾向に転じた。更に止血後の充足および覚醒により更に上昇し最終的に約80mmHgまで回復した。

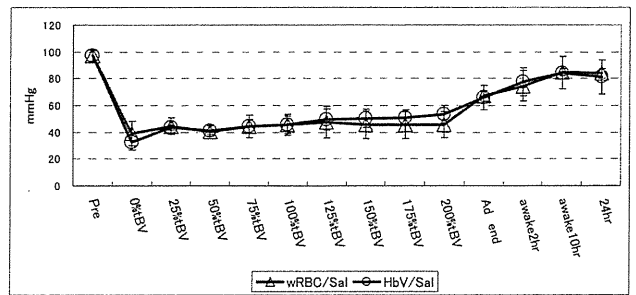


Fig. 5 Mean Arterial Pressure, no significant difference ($P < 0.05$)

b. 心拍数および呼吸数

出血開始にともなって、心拍数は低下をみしたが、25%量注入時点で緩やかとなり、約200打/分で安定に推移した。一方、呼吸数では緩やかな減少傾向が認められたものの、両群に差はなく、吸入麻酔の影響と考えられた。

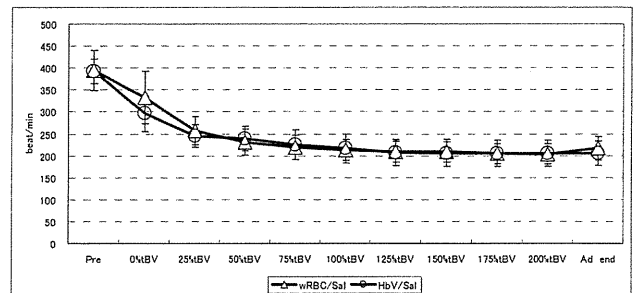


Fig. 6 Heart Rate, no significant difference ($P < 0.05$)

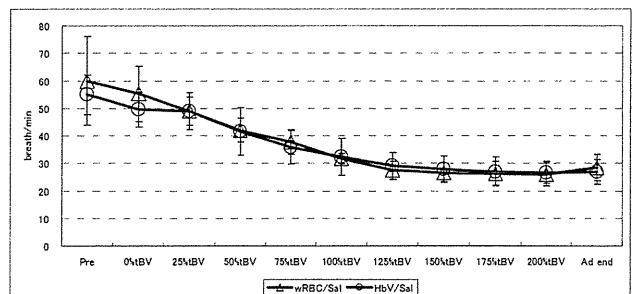


Fig. 7 Respiration Rate, no significant difference ($P < 0.05$)

4. 組織酸素分圧および血流量 (Fig. 8 Fig. 9)

出血前を100とする相対値を示した。腹部皮下の組織酸素分圧では両群間の推移に差は認められず ($P = 0.1749 \sim 0.8475$)、蘇生による回復も認められなかった。

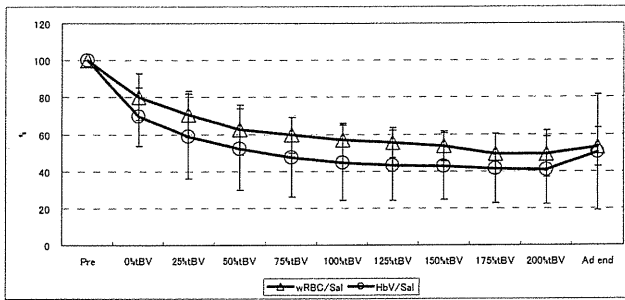


Fig. 8 PtO₂, no significant difference (P<0.05)

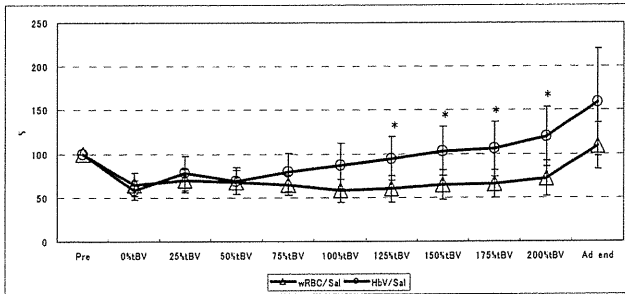


Fig. 9 Flow, *: significant difference (P<0.05)

一方、下腹部表皮血流では100%注入時点から200%時点までHbV/Sal群の有意な上昇が認められた。HbV/Sal群の循環血液量が比較的保たれている期間と符号しており、出血抑制が末梢循環量確保に重要であることを示す一方で、出血が継続している場合では毛細血管まで蘇生液が到達することが困難であることを示唆した。

5. Base Excess、血中乳酸値、血中pH (Fig. 10 Fig. 11 Fig. 12)

Base Excessは循環血液量の変動に応じて出血/蘇生中は低値傾向に推移したが、止血・覚醒後は回復傾向に転じた。同様に血中乳酸値も循環量変動に応じて出血過多の期間は高値に推移したが、循環量回復に伴って低下し、蘇生開始後24時間では2mmol/L以下となった。

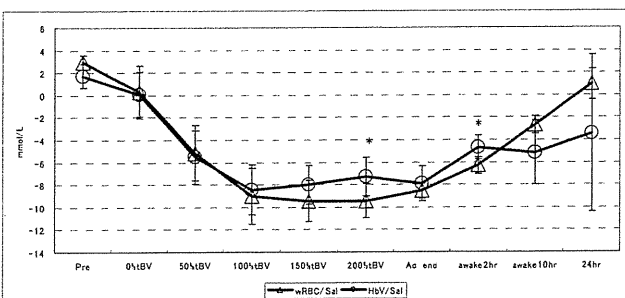


Fig. 10 Base Excess, *: significant difference (P<0.05)

一方、血中pHは蘇生・充足終了まで緩やかに低下した。これは吸入麻酔下の呼吸数推移に応じた変化であり、覚醒後はほぼ正常値に回復した。

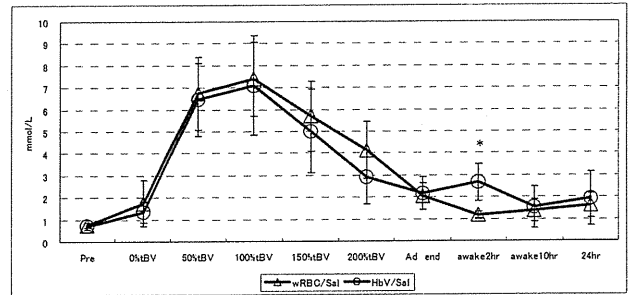


Fig. 11 Lactate, *: significant difference (P<0.05)

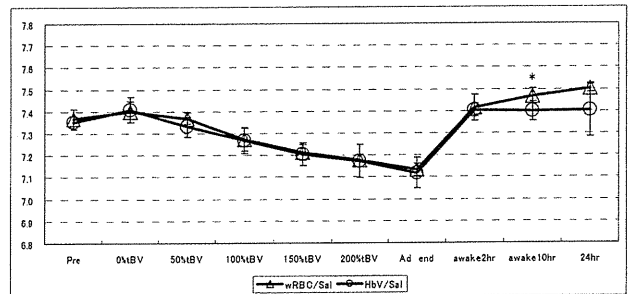


Fig. 12 pH, *: significant difference (P<0.05)

6. 動脈血酸素分圧および二酸化炭素分圧 (Fig. 13 Fig. 14)

動脈血酸素分圧は出血/蘇生中に高値推移したものの、循環不足量充足によって低下した。覚醒期間中では2時間後に一過性の上昇が認められたものの、蘇生開始後24時間では正常に復した。蘇生の途中、HbV/Sal群に有意な低値が認められたが、出血量抑制による効果と考えられた。

二酸化炭素分圧では50%注入まで低下傾向を示したがその後、上昇に転じ、循環量充足まで高値であった。一方、覚醒後は一貫して低値に推移した。

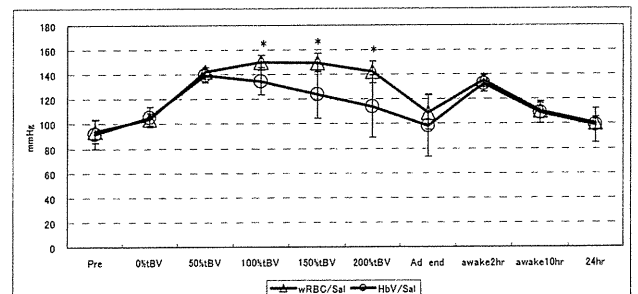


Fig. 13 pO₂, *: significant difference (P<0.05)

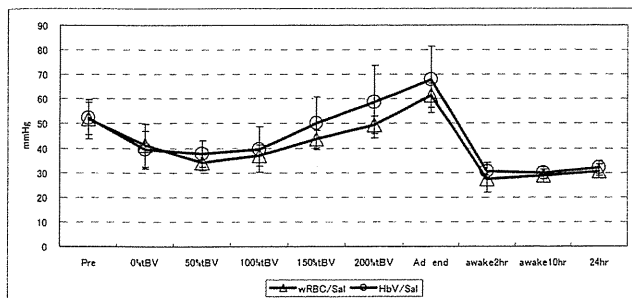


Fig. 14 pCO₂, no significant difference (P<0.05)

D. 考察

制御不能出血の初期治療がどうあるべきかは1990年代より多くの研究者による基礎・臨床研究を通じて議論がなされている分野である。本邦において、救急救命士は気道の確保としての挿管は行うものの、救急搬送中の輸液は通常行わない。このため、救急搬送における蘇生治療がどのようにあるべきかについては臨床的な検討が行われることが少なかった。一方で、欧米では、現在使用されている蘇生液には酸素運搬能がないことが輸液による蘇生後の臓器障害に結びついている可能性も指摘されている。その為、本研究グループで研究が進められているHbVは酸素運搬を伴う輸液製剤なので、Permissive hypotensionの状況下でも臓器に酸素供給を行って、臓器機能の虚血による不可逆的傷害を防ぐ可能性があると考えられ、制御不能の出血においても救命に有効な蘇生液として使用される可能性があると考えられる。

昨年度までの研究では救急搬送中の生命維持に焦点を当てて検討を行ったが、今年度はより長時間の生命維持について検討した。

昨年度の研究では速度56mL/kg/hr、蘇生液含有ヘモグロビン濃度8.6g/dLで蘇生を2時間行った場合、全例が生存することを報告したが、今年度は速度が半分の28mL/kg/hr、蘇生液のヘモグロビン量が約5g/dLで4時間蘇生しても同等の結果が得られ、単位時間当たりの使用量も1/3~1/4に抑制できることを示した。

HbVを含め、現在開発中のヘモグロビンを利用

した人工酸素運搬体はポリエチレングリコールなどを表面に修飾することで血中滞留性の向上が図られているが、酸素運搬能力はより短時間で喪失する。赤血球の場合、ヘモグロビン中の鉄原子は時間経過に伴って酸化され、酸素結合能力を持たない3価へ変化するが、赤血球膜にある還元系によって2価に戻り、再び酸素運搬能力を発揮する。しかし、ヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体では、ヘモグロビンの精製過程で還元系を失ってしまう為、赤血球と比較して、酸素運搬が可能な時間が短くなる。また、人工的に還元系を付与に関する研究はまだ途上にある。そこで、新鮮な人工酸素運搬体を補液剤として点滴注入し、酸素運搬能力のあるヘモグロビンの濃度維持を図ったところ、蘇生開始後24時間までの生存性では、洗浄赤血球を用いた蘇生群とほぼ同等の生存性が得られた。

その他のデータについては、一部に統計学的な差がみとめられるものの、wRBC/Sal群およびHbV/Sal群はほぼ同等の推移を示しており、HbVが状態を増悪するような所見は得られなかった。

E. 結論

制御不能出血のモデルに対する連続注入において、HbV混入蘇生液は洗浄赤血球と同等の効果を示すだけでなく、止血後のHbV補充療法によって有効期間を延長することが可能であるなど、大量出血時の蘇生治療において極めて有効な手法であることが示唆された。

7. ラット制御継続出血ショックモデルを用いた生理食塩液分散ヘモグロビン小胞体 (HbV) による蘇生法の検討

A. 研究目的

これまで我々のグループでは、大量輸液を念頭に置いた動物モデルを用いてヘモグロビン小胞体の効果に関する検討を重ねてきたが、ヘモグロビン小胞体は生理食塩液に分散されており、浸透圧維持の観点から、アルブミンやヒドロキシエチルスターチとの混合液、または併用使用することが前提であった。一方、医薬品開発の観点では、薬剤単独の効能及び毒性に関する情報を得ることが重要である。そこで、本年度は臨床試験を想定し、生食分散ヘモグロビン小胞体を直接投与する是非について検討する一環として、ラットに対して膠質成分を用いずにヘモグロビン小胞体を投与した。尚、基本的なモデルとして、ラット50%制御出血ショックモデルを用いた予備検討を実施したところ、比較対照として設定した生理食塩液群（晶質液）では、晶質液成分の血管漏出によって相対的にヘマトクリットが維持された為に決定的な酸素不足に至らず、対照として不適當であることが判明した。また、昨年度に使用したラット制御不能尾動脈出血モデルでは、生理食塩液群の多数が致死したものの、出血量を制御しない為に個体差が拡大することが問題であった。そこで、本年度は、出血量の機械的制御と輸液を同時に行うことで、残存赤血球を減少させた。

B. 研究方法

1. 群構成及び検体調製

群構成は生理食塩液、ヘモグロビン小胞体生食分散液、洗浄赤血球生食分散液及び生理食塩液を輸液検体とする3群とし、1各群6例、計18例で実施した。

ヘモグロビン小胞体生食分散液はニプロ株式会社にて委託製造し、生理食塩液は市販局方製剤を使用した。洗浄赤血球生食分散液は、ヘパリン加

同種血液を遠心分離（4℃，2000g×15分）して血漿及びバフィーコートを除去した後、生理食塩液を加えて2回洗浄して得られた赤血球に生理食塩液を加え、ヘモグロビン小胞体と同程度のヘモグロビン含量（Hb=10.0±0.5g/dL）に調製した。

2. 試験系及び外科処置

Wistar系、雄性ラット（体重337.1±15.4g）を用い、セボフルラン麻酔の自発吸入下にて外科処置及び出血ショック蘇生を実施した。外科処置として、頸動脈及び大腿動脈にポリエチレンカテーテルを挿管し、尾静脈に留置針を刺入した。これらの内、大腿動脈を麻酔下での血圧測定、尾静脈を輸液経路とした。一方、頸動脈カテーテルは皮下を經由して頸背部より体外へ誘導し、脱血及び採血に使用した。更に、覚醒処置の際に、採血/血圧ポートへ加工し、動物行動の自由を確保した。

3. 出血ショック惹起及び輸液蘇生 (Fig. 1)

ラットの循環血液量を56mL/kgとして、頸動脈から速度28mL/kg/hrで1時間脱血し、循環量の50%を脱血した。更に、脱血を継続しながら、輸液検体を速度56mL/kg/hrで1時間点滴注入した。ここで脱血を終了し、各群の輸液検体を生理食塩液へ変更して2時間点滴注入した。総注入量は脱血量の3倍に達した。その後、麻酔下で1時間静置し、カテーテル除去、採血ポート加工を施して覚醒させた。

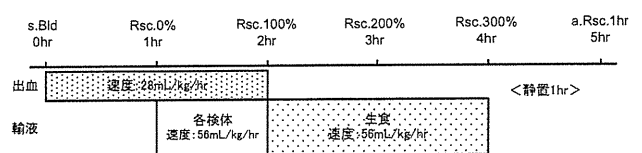


Fig. 1 出血ショック惹起と蘇生法

4. 観察及び測定

測定項目は輸液蘇生開始後の生存時間（最長24時間）、平均動脈血圧、ヘマトクリット値（マイクロヘマトクリット法）、血中乳酸値、Base excess、

pH, 動脈血二酸化炭素分圧, 動脈血酸素分圧及び電解質 (Ca²⁺, K⁺, Cl⁻, Na⁺) とし, 脱血開始前 (Pre), 輸液開始 (Rsc.0%), 50%輸液 (Rsc.50%), 100%輸液 (Rsc.100%), 200%輸液 (Rsc.200%), 300%輸液到達 (Rsc.300%), 輸液終了後1時間 (a.Rsc.1hr), 覚醒後4時間 (a.Awk.4hr), 10時間 (a.Awk.10hr), 16時間 (a.Awk.16hr) 及び輸液開始後24時間 (s.Rsc.24hr) の11時点に測定した。得られたデータは, 可能な限り, 多群間検定による統計処理を行った (P = 0.05)。

C. 結果

1. 生存分析 (Fig. 2)

生理食塩液群は多数が麻酔期間中に死亡し, 蘇生開始後24時間の生存を達成する個体は現れなかった。一方, ヘモグロビン小胞体群は5/6例, 赤血球群は全例が蘇生開始後24時間の生存を達成し, 生理食塩液群との間に有意差が認められた。また, ヘモグロビン小胞体群の1例が早期に死亡したが, 洗浄赤血球群との間に有意差は認められなかった。

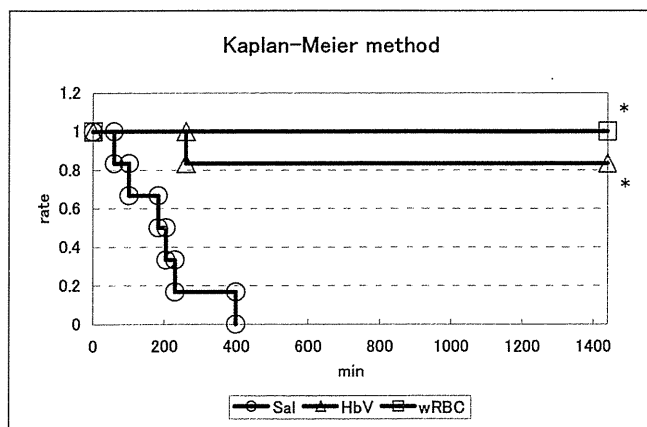


Fig. 2 Survival curve, *: v.s. Sal (P<0.05)

2. ヘマトクリット及び平均動脈血圧(Fig. 3)

ヘマトクリット推移では, 循環量50%脱血によって, 各群とも約30%まで低下した。各検体での輸液蘇生を開始したところ, ヘモグロビン小胞体群及び生理食塩液群では, 同様の低下傾向を示し, 3倍量輸液終了時点で約12%に達した。一方, 洗浄赤血

球群は赤血球供給に伴い, 上昇に転じたが, 輸液剤を生理食塩液へ交換した後は再び低下傾向に推移した。覚醒後の推移では, ヘモグロビン小胞体群は僅かに低下傾向を示したが, 洗浄赤血球群は覚醒初期に著しく減少し, その後, 緩やかな低下へ変化した。

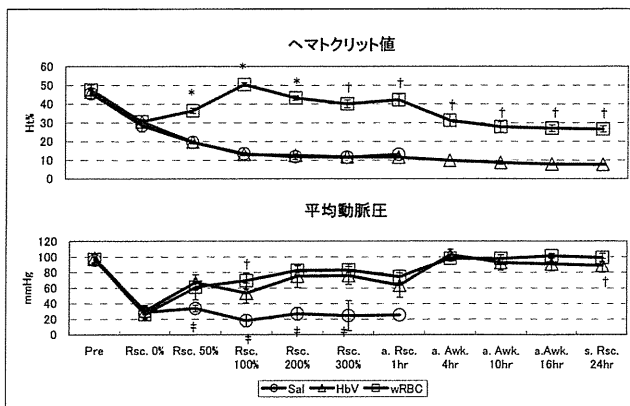


Fig.3 Hematocrit and Mean arterial pressure, *: wRBC v.s. Sal and HbV, †: HbV v.s. wRBC, ‡: Sal v.s. HbV and wRBC (P<0.05)

平均動脈血圧推移では, 50%脱血の結果, 各群とも約30mmHgまで低下したが, 輸液開始によって, ヘモグロビン小胞体群及び洗浄赤血球群が上昇へ転じ, 覚醒後はほぼPre値水準まで回復した。一方, 生理食塩液群はヘマトクリットがヘモグロビン小胞体群と同等であるにも関わらず, 低値に推移し, 5/6例が麻酔期間中に死亡した。

3. 血中乳酸値, ベースエクセス及びpH (Fig. 4)

血中乳酸値は, 50%脱血時点で各群とも5-6mmol/L程度まで上昇したが, ヘモグロビン小胞体群及び洗浄赤血球群では脱血継続中にも関わらず輸液開始によって低下傾向に転じた。その後, ヘモグロビン小胞体群では, 脱血終了時及び蘇生終了後24時間に多少の上昇が認められたが, 生食への輸液剤変更以降は概ね低下傾向を示した。洗浄赤血球群は, 脱血終了及び輸液剤交換に関係なく, 低下傾向を示した。一方, 生理食塩液群では輸液開始後も上昇傾向を示し, 200%輸液時点でピークを迎えたが, その後は低下傾向に転じ, 覚醒

早期に全例が致死した。

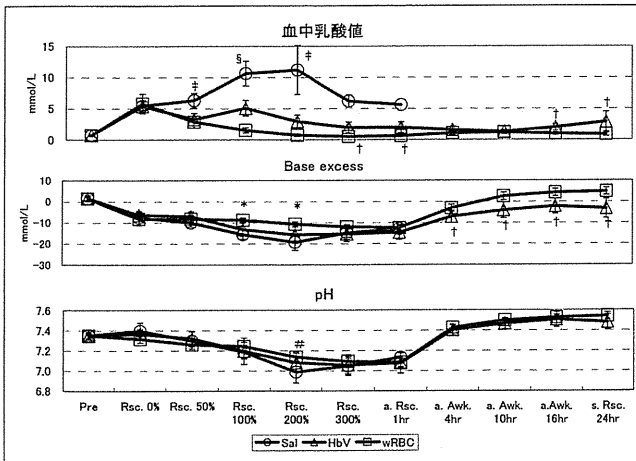


Fig. 4 Lactate, Base excess and pH, *: wRBC v.s. Sal and HbV, †: HbV v.s. wRBC, ‡: Sal v.s. HbV and wRBC, §: Sal v.s. HbV v.s. wRBC, #: Sal v.s. wRBC (P<0.05)

ベースエクセスでは、50%脱血によって各群ともマイナスを示し、麻酔期間中は低値のまま推移した。100%輸液及び200%輸液時点ではヘモグロビン小胞体群及び生理食塩液群と洗浄赤血球群の間に有意差が認められたが、輸液終了後1hr（麻酔下）では3群ともほぼ同等の値を示した。覚醒後では、ヘモグロビン小胞体群と洗浄赤血球群は共に回復傾向に転じたが、両群間には有意差が認められた。

pHでは、各群とも麻酔期間中は低下、覚醒後は回復傾向を示し、200%輸液時点で洗浄赤血球群と生理食塩液群の間に有意差が認められたものの、総じて3群とも類似の推移であった。

4. 動脈血二酸化炭素分圧及び酸素分圧 (Fig. 5)

二酸化炭素分圧では、各群とも50%脱血によって低下したが、輸液開始によって上昇に転じ、麻酔期間中は上昇傾向に推移した。ヘモグロビン小胞体群と洗浄赤血球群はほぼ同等の推移であったが、生理食塩液群は若干低値であり、200%輸液時点で洗浄赤血球群との間に有意差が認められた。覚醒後では、洗浄赤血球群は生理値付近で安定推移したものの、ヘモグロビン小胞体群が若干低値とな

り、一部で有意差が認められた。

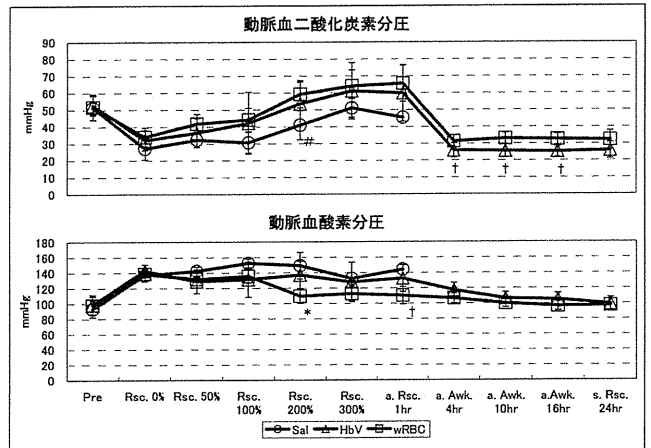


Fig. 5 Arterial blood pCO₂ and pO₂, *: wRBC v.s. Sal and HbV, †: HbV v.s. wRBC, #: Sal v.s. wRBC (P<0.05)

酸素分圧では、50%脱血により3群とも増加傾向を示したが、輸液開始によってヘモグロビン小胞体群は若干低下して安定、洗浄赤血球群は脱血停止で更に低下して安定となったが、生理食塩液群は比較的高値のまま推移した。覚醒後では、ヘモグロビン小胞体群及び洗浄赤血球群共に経時的に生理値付近まで低下傾向を示し、輸液開始後24時間で回復した。

5. カルシウム、カリウム、塩素及びナトリウムイオン (Fig. 6)

麻酔期間生食200%輸液中のカルシウムイオン濃度では、洗浄赤血球群及び生理食塩液群がほぼ同様の推移を示したのに対し、ヘモグロビン小胞体群は有意な低値を示した。また、覚醒後では、ヘモグロビン小胞体群及び洗浄赤血球群とも脱血開始前 (Pre) よりも低値推移を示した。しかし、何れの変化も僅かな範囲に留まっていた。

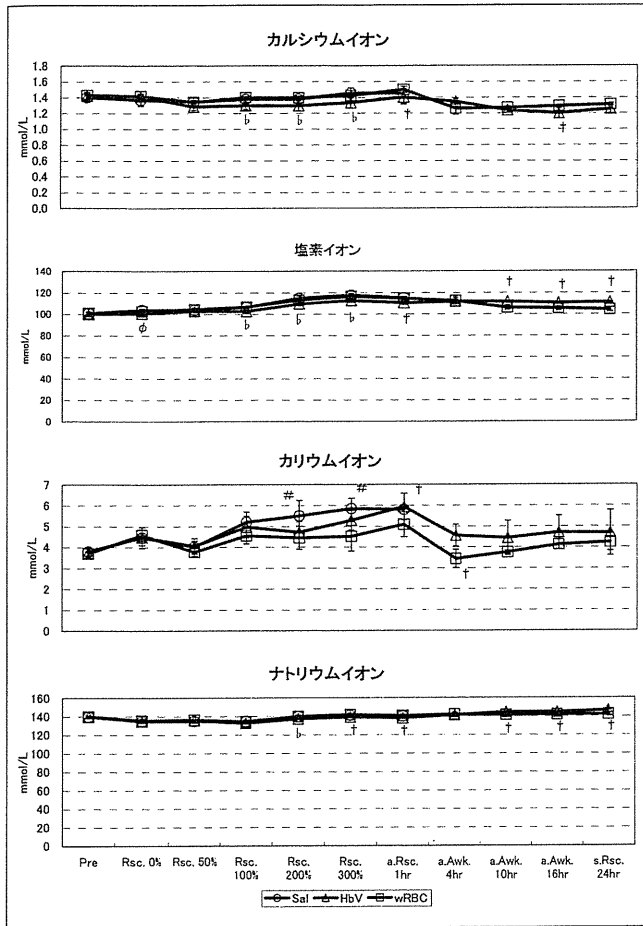


Fig. 6 Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Na^+ , †: HbV v.s. wRBC, #: Sal v.s. wRBC, b: HbV v.s. Sal and wRBC, φ: Sal v.s. HbV ($P < 0.05$)

麻酔期間のカリウムイオンでは、各群とも脱血開始前よりも高値傾向となり、輸液終了後1時間で全群が 5mmol/L 以上となった。しかし、覚醒後は、ヘモグロビン小胞体群が約 4.5 、洗浄赤血球群が $3.5\text{--}4.0\text{mmol/L}$ 程度にまで低下し、生理的範囲に回復した。

塩素イオン及びナトリウムイオンでは、ヘモグロビン小胞体群の生食輸液時が他2群と比較してより低値を示したが、覚醒後は、逆に洗浄赤血球群よりも高値に推移した。しかし、何れの変化も僅かな範囲に留まっていた。

D. 考察

晶質液輸液による出血性ショック蘇生を念頭に、

生食分散ヘモグロビン小胞体を含む大量輸液による蘇生について検討したところ、生理食塩液のみで蘇生した群は全例が早期に致死したのに対して、ヘモグロビン小胞体あるいは洗浄赤血球による輸液を適用した群では、輸液蘇生後24時間以上の生存を達成する個体が現れ、生存性向上が確認された。

一般に、晶質液による輸液蘇生では晶質液の血管外漏出による循環血液量減少並びに血圧低下を抑制する目的で出血量の3倍に相当する容量の注入が必要とされており、本検討も脱血操作及び各検体輸液終了後に総循環量の2倍に相当する生理食塩液を輸注している。この時点では、生理食塩液蘇生群もヘマトクリットは12%程度を維持しており、多少の酸素不足を来すものの、致死的な水準ではない。しかし、生理食塩液のみの輸液蘇生では、輸液開始時の血圧を維持するが、昇圧することは出来ず、更に乳酸値上昇やベースエクス低下を招くなど重度の酸素不足による代謝異常を呈して死亡した。一方、ヘモグロビン小胞体を含む輸液蘇生では、輸液開始直後から血圧上昇が認められ、覚醒後では、代謝関連の指標も含め、ほぼ生理的水準まで回復した。欧米にて開発されたヘモグロビン由来人工酸素運搬体における問題の一つとして、遊離ヘモグロビンのNO捕捉を主因とする血管収縮によって著しい血圧上昇を生じることが知られているが、ヘモグロビン小胞体群の血圧推移は洗浄赤血球群とほぼ同等であり、本邦で開発された細胞型人工酸素運搬体の優位性が示された。

ヘモグロビン小胞体と生理食塩液の併用に関して、血圧、乳酸値、pH、二酸化炭素分圧などは麻酔期間及び覚醒期間を通じて洗浄赤血球群とほぼ同様の推移を示しており、同程度のヘモグロビン濃度を有してれば、著しい悪影響は出現し無い様である。一方、動脈血酸素分圧についてはヘモグロビン小胞体群の生食輸中期間が、洗浄赤血球群の推移から解離しており、最終的には同水準とな

るものの、脱血に伴う酸素分圧上昇からの回復に多少の遅れが認められる。また、電解質については、ヘモグロビン小胞体群と洗浄赤血球群の間で、カルシウム、塩素及びナトリウムイオンで、麻酔期間中と覚醒期間中の推移が微量ながら異なっており、臨床への影響について更に精査する必要があると認められた。カリウムイオンに関しては、ヘモグロビン小胞体群が洗浄赤血球群よりも若干高値に推移したが、同様の挙動である上に、個体差が大きいため、影響は少ないと考えられた。

E. 結論

生食分散ヘモグロビン小胞体による大量晶質液輸液蘇生では、電解質バランスに多少の影響が認められるものの、赤血球と同程度の血圧上昇効果や乳酸値上昇抑制効果が認められ、生存性が向上するなど、出血性ショックに対して十分な効果を示したことから、単体でも輸液蘇生剤として有効であり、重篤な悪影響を及ぼさないと結論された。

8. メチレンブルー及びアスコルビン酸を配合した還元剤適用によるヘモグロビン小胞体の機能回復の試み

A. 研究目的

これまで、各種出血ショックモデルや血液交換モデルを用いて、大量使用時においてもヘモグロビン小胞体には赤血球に匹敵する蘇生効果があることを示してきた。しかしヘモグロビン小胞体は製造過程において赤血球膜に存在する還元系を失う為、赤血球に比べてヘモグロビンが早期にメトヘモグロビンへ変化してしまい、酸素運搬機能を発揮できる時間が著しく短くなることが問題であった。この課題を解決する一つの方法として、未劣化ヘモグロビン小胞体を点滴投与することで出血ショック惹起から24時間の生存が可能になることを昨年報告した。しかし、その方法では、生存時間の延長に伴って、血管内のヘモグロビン濃度が著しく上昇するなど、血行動態に悪影響を与えることが予測されており、根本的な解決には程遠いのが状況である。一方、ヘモグロビン小胞体に還元系を組み込む試みは、以前より継続されており、一定の成果を上げているものの、未だ製剤としては未完成である。

そこで、今年度はヘモグロビン小胞体と既に臨床使用例のある還元剤を生体内で反応させることによって、酸素運搬能が低下したヘモグロビン小胞体の機能を回復させる方法について検討した。

B. 研究方法

1. 高 MetHb 含有ヘモグロビン小胞体の大量投与によるラット高メトヘモグロビン血症モデルを用いた予備検討

還元剤の効果を確認する為に、各群少数例による以下の予備検討を実施した。

(1)試験系

8-9 週齢の Wistar 系雄ラット（体重約 350g）に高濃度のメトヘモグロビン（47.7-90.2%，平均

78.7%）を含む劣化ヘモグロビン小胞体を容量 28mL/kg（11 例）または 56mL/kg（1 例）、速度 28mL/kg/hr で点滴静脈内投与した。更に 1 時間麻酔下にて静置して状態を安定化し、メトヘモグロビン血症モデルを作製した。

(2)還元剤投与

少数例での予備検討として、メチレンブルー水溶液（0.03%）、アスコルビン酸水溶液（1%）、メチレンブルーとアスコルビン酸の混合水溶液及び局方蒸留水を用意し、覚醒後の動物へ胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与容量は 5mL/kg×3 回（覚醒直後、覚醒後 1 及び 3 時間）とした。更に、メチレンブルー-アスコルビン酸混合液については、生理食塩液に溶解した検体を調製し、静脈内投与（容量 3mL/kg/hr×5hr、麻酔下にて実施）、皮下投与（容量 15mL/kg）及び腹腔内投与（容量 15mL/kg）を試みた。

(3)観察・測定

メトヘモグロビン血症モデル作製中を含め、還元剤投与開始後 24 時間まで経時的に採血を行い、血液ガス分析装置にてメトヘモグロビン比率を測定した。

2. ラット高度血液交換モデルを用いた還元剤投与の効果

メチレンブルー-アスコルビン酸混合液の経口投与によるメトヘモグロビン還元効果を確認する為に、血液交換法を用いて、ヘモグロビン小胞体による高度血液置換を課したモデルを作製した。

(1)群構成、輸液剤及び投与検体調製

群構成は、ヘモグロビン小胞体を含む輸液剤で血液交換し、還元剤を経口投与した群（HbV+Rd 群、n=6）、ヘモグロビン小胞体を含む輸液剤で交換し、生理食塩液を経口投与した群（HbV+Sal 群、n=5）及び洗浄赤血球を含む輸液剤で交換し、還元剤を経

口投与した群 (wRBC+Rd 群, n=5) の 3 群とし、計 16 例で実施した。

ヘモグロビン小胞体生食分散液はニプロ株式会社にて委託製造し、等量のヒドロキシエチルスターチ (HES ; サリンヘス®, フレゼニウスカービジャパン株式会社) と混合して交換輸液に供した。また、洗浄赤血球生食分散液は、ヘパリン加同種血液を遠心分離 (4°C, 2000g×15 分) して血漿及びバフィーコートを除去した後、生理食塩液を加えて同様に 2 回洗浄し、洗浄後の赤血球に生理食塩液を加えてヘモグロビン小胞体と同程度のヘモグロビン含量 (Hb=10.0±0.5g/dL) に調製した。更に等量の HES と混合して交換輸液に供した。

還元剤は、メチレンブルー 0.14% 及びアスコルビン酸 2.0% の濃度に調製した。即ち、動物用医薬品の 0.82% メチレンブルー水溶液 1.710mL 及び日本薬局方ビタミン C 原末 0.200g を秤量し、日本薬局方生理食塩液を総量 10.0g まで加えて溶解した。更に、0.20µm フィルタにて濾過滅菌し、経口投与に供した。

(2) 試験系及び外科処置

Wistar 系、雄性ラット (体重 337.9±14.4g) を用い、セボフルラン麻酔の自発吸入下にて外科処置及び血液交換を実施した。外科処置として、頸動脈及び大腿動脈にポリエチレンカテーテルを挿管し、尾静脈に留置針を刺入した。これらの内、大腿動脈を脱血及び麻酔下採血経路、尾静脈を輸液経路とした。一方、頸動脈カテーテルは皮下を經由して頸背部より体外へ誘導し、血圧測定及び覚醒下採血経路に使用した。更に、血液交換終了後に大腿動脈及び尾静脈から抜管及び閉創し、頸動脈カテーテルを採血/血圧ポートへ加工して覚醒後の測定、採血及び行動の自由を確保した。尚、外科処置中を含めて経口投与初回 (血液交換終了後 12 時間) までに 5/21 例が死亡したが、モデル形成失敗と判断して除外し、16 例を試験系として採用した。

(3) 血液交換 (Fig. 1)

脱血及び輸液速度は 56mL/kg/hr に設定した。動物の自己赤血球を十分に排除し、且つ、ヘモグロビン小胞体の消費量を抑制する為、血液交換を 3 段階に分けて実施した。即ち、第 1 段階では、1.5 時間に渡り、84mL/kg の HES と等量交換を課した。第 2 段階では、脱血を継続したまま、輸液剤をヘモグロビン小胞体-HES 混合液または、洗浄赤血球-HES 混合液へ変更し、同時交換を 1 時間継続した。第 3 段階では、脱血を停止し、輸液剤のみを 1 時間継続注入した。尚、外科処置終了後に、血液交換中の凝固防止の目的でヘパリンナトリウム 500U/body を輸液経路から投与し、全身をヘパリン化した。

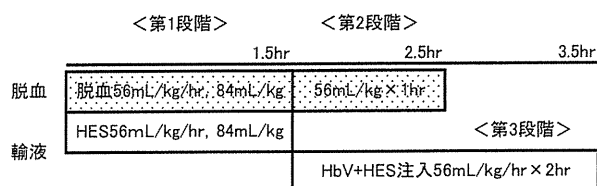


Fig. 1 血液交換法

(4) 還元剤投与

血液交換終了後 12, 18 及び 24 時間の観察測定終了後に、小動物用胃ゾンデを用いて強制経口投与した。即ち、HbV+Rd 群及び wRBC+Rd 群にメチレンブルー-アスコルビン酸混合液を、HbV+Sal 群に生理食塩液を適用した。投与容量は各回とも 5mL/kg, 合計で 15mL/kg とした。

(5) 観察及び測定

測定項目は血液交換終了後の生存時間 (最長 48 時間), 心拍数, 平均動脈血圧, ヘマトクリット値 (マイクロヘマトクリット法), Base excess, 血中乳酸値, pH, ヘモグロビン濃度, メトヘモグロビン比率及び電解質 (Ca²⁺, K⁺, Cl⁻, Na⁺) とし, 交換開始前 (Pre), 輸液剤交換 (c.Fid), 脱血終了 (e.Bld), 輸液終了 (e.Trf), 交換終了後 6 時間 (a.Exc6hr), 12 時間 (a.Exc12hr), 18 時間 (a.Exc18hr), 24 時間 (a.Exc24hr) 及び 48 時間 (a.Exc48hr) の計 9 時点に実施した。尚, 全例とも交換

終了後 24 時間まで 1 時間毎に生存確認を行い、状態悪化例については 24 時間以降も頻繁な生存確認を行った。

得られたデータは、HbV+Rd 群及び HbV+Sal 群間あるいは、HbV+Rd 群及び wRBC+Rd 群間について、それぞれ 2 群間検定による統計処理 (P=0.05) を行った。尚、生存時間については死亡発見時に死後硬直が認められた個体は直近の生存確認時刻、硬直が認められなかった個体は発見時刻に基づいて生存時間を算出し、統計処理を施した。また、心拍数、平均動脈圧及び電解質については、交換開始前、輸液終了、交換終了後 24 及び 48 時間の 4 時点の評価した。

C. 結果

1. 高 MetHb 含有ヘモグロビン小胞体の大量投与によるラット高メトヘモグロビン血症モデルを用いた予備検討

(1)ヘモグロビン小胞体大量投与の影響 (Table 1)

56mL/kg のヘモグロビン小胞体浮遊液 (HbV) を点滴静注したところ、注入前と注入後 1 時間のヘマトクリット値 (Ht) は変化が少なく、ヘモグロビン小胞体液の晶質液成分は速やかに血管外へ漏出することが認められた。また、ヘモグロビン量 (Hb) は注入量に応じて増加した。しかし、還元剤投与後 24 時間では、ヘマトクリット値及びヘモグロビン量が共に低下しており、網内系でのヘモグロビン小胞体捕捉の他、間質液の血管内再流も生じていた。一方、28mL/kg のヘモグロビン小胞体を静注した場合でも同様の傾向が認められており、ヘモグロビン小胞体の大量投与は循環量過多を招くことが判明した。

Table 1, HbV 注入モデルの特性 (平均±標準偏差)

HbV 点滴静注量	例数	単位:	Ht	Hb
			%	g/dL
28mL/kg/hrX2hr (56mL/kg)	1	注入前	46	15.3
		注入後 1hr	42	22.4
		還元開始後 24hr	32	17.8
28mL/kg/hrX1hr (28mL/kg)	11	注入前	45.0±1.7	15.0±0.6
		注入後 1hr	39.5±2.3	17.2±0.8
		還元開始後 24hr	35.1±2.1	15.6±0.6

(2)還元剤投与の効果 (Fig. 2)

経口投与した群では、蒸留水投与 (DW/PO) で、経口投与後 5 時間にメトヘモグロビンの急増が認められた後、24 時間で若干低下した。アスコルビン酸投与 (AA/PO) では、僅かながら経時的な増加が認められた。また、メチレンブルー投与 (MB/PO) では、僅かながら、経時的な低下が認められたものの、ヘモグロビン量の推移 (Table 1) から、ヘモグロビン小胞体の網内系捕捉によるメトヘモグロビンの減少によるものである可能性が高く、還元効果があるとは認められなかった。一方、メチレンブルー-アスコルビン酸混合液投与 (MA/PO) では、経口投与開始後 5 時間以降にメトヘモグロビン比の顕著な低下が認められた。

続いて、メチレンブルー-アスコルビン酸混合液を静脈内点滴投与 (MA/IV)、皮下投与 (MA/SC) 及び腹腔内投与 (MA/IP) したところ、いずれの経路においてもメトヘモグロビン比の急速な低下が確認されたが、還元剤投与開始後 24 時間では再上昇が認められたことから、経口投与と比較して即効性があるものの、効果の持続時間が短いことが判明した。

以上の如く、メチレンブルー-アスコルビン酸混合液には、メトヘモグロビン比率を低下させる効果が認められた。しかし、ヘモグロビン小胞体大量投与モデルには十分な自己赤血球が残存している為、酸素運搬に関する知見を得ることは出来なかった。

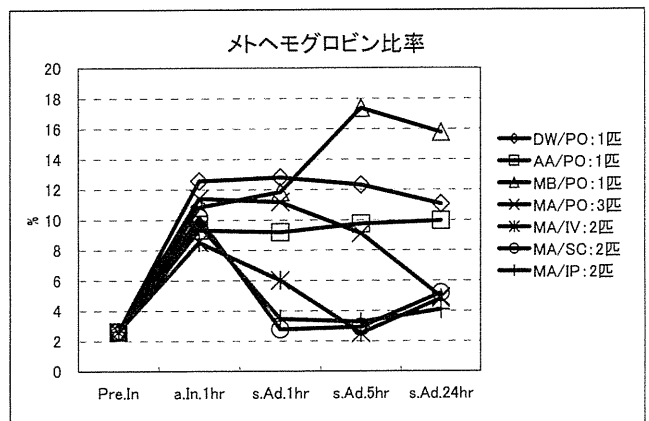


Fig. 2 Rate of methemoglobin

2. ラット高度血液交換モデルを用いた還元剤投与の効果

(1) 生存性 (Fig. 3)

HbV+Rd 群では、4/6 例 (66.7%) が交換終了後 48 時間以上生存した。一方、HbV+Sal 群では、5 例全例が 48 時間以内に死亡した。また、wRBC+Rd 群は 5 例全例が 48 時間以上生存した。尚、HbV+Rd 群での死亡 2 例は発見時に死後硬直が認められており、直近の生存確認時刻を死亡時刻とした為、実際よりも短縮された生存時間を採用した。

生存時間についてログランク検定を行ったところ、HbV+Rd 群と HbV+Sal 群の間に有意差が認められた ($P=0.0478$)。一方、HbV+Rd 群と wRBC+Rd 群の間に差は認められなかった ($P=0.1766$)。

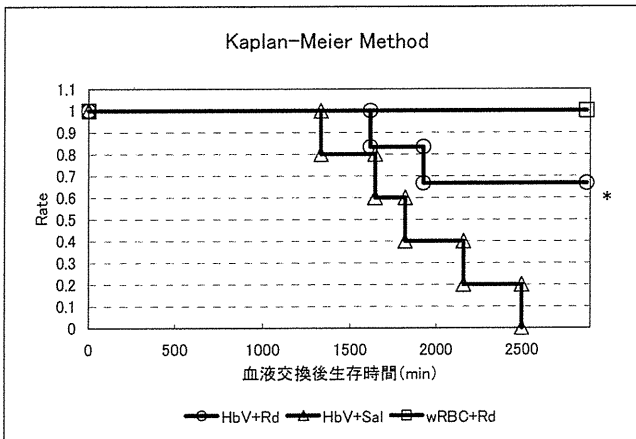


Fig. 3 Survival, *: HbV+Rd vs. HbV+Sal ($P = 0.05$)

(2) ベースエクセス, 血中乳酸値及び pH (Fig. 4)

ベースエクセスでは、各群とも交換輸液終了時 (e.Trf) まで低下傾向にあったが、覚醒により上昇, 生理値への回復傾向を示した。HbV+Rd 群は交換終了後 24 時間 (a.Exc24hr) までは安定して推移したものの、48 時間に低下を示した。HbV+Sal 群は 18 時間まで HbV+Rd 群と同等の推移を示したが、24 時間では HbV+Rd 群に対して有意な低値を示し、48 時間までに全例が死亡した。wRBC+Rd 群は HbV+Rd 群に対して脱血終了 (e.Bld) から交換終了後 6 時間まで有意な低値を示したが、以降 24 時間までは同等に推移し、48 時間では有意な高

値を示した。

血中乳酸値では、各群とも輸液剤交換時 (c.Fld) に高値傾向を示したが、交換終了時には生理値付近まで回復し、その後 12 時間までは概ね安定推移した。HbV+Rd 群は 24 時間まではほぼ一定であったが、48 時間では若干上昇した。HbV+Sal 群は HbV+Rd 群に対して輸液交換時に有意な高値を示した他、18 及び 24 時間に有意な高値を示した。wRBC+Rd 群は HbV+Rd 群に対して 18 時間に有意な低値を示したが、24 及び 48 時間まで安定して推移した。

pH では、各群とも輸液終了時まで低下傾向を示したが、覚醒後は生理値よりも若干高値で安定推移した。HbV+Rd 群及び HbV+Sal 群はほぼ同等に推移したが、wRBC+Rd 群は HbV+Rd 群に対して脱血終了時、輸液終了時、交換後 6 及び 24 時間で有意な低値を示した。

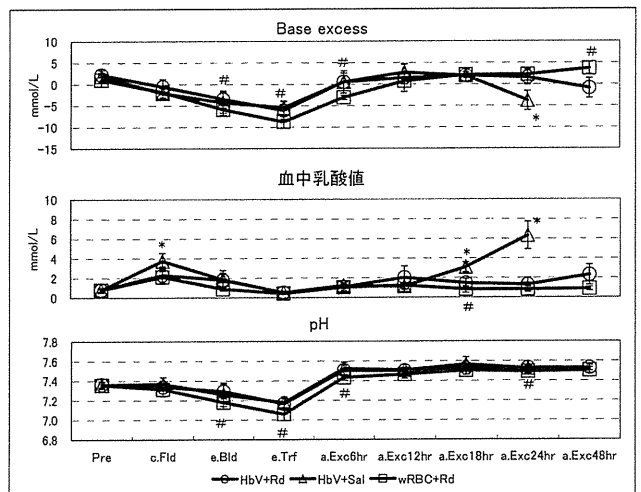


Fig. 4 Base excess, lactate and pH, *: HbV+Rd vs. HbV+Sal, #: HbV+Rd vs. wRBC+Rd ($P = 0.05$)

(3) ヘマトクリット, ヘモグロビン濃度及びメトヘモグロビン比率 (Fig. 5)

ヘマトクリット値では、各群とも輸液剤交換時 (c.Fld) に 6-7% まで低下した。HbV+Rd 群及び HbV+Sal 群はその後も低下し、交換終了時 (e.Trf) では 1.5% 程度を示した。以降は僅かに上昇傾向に転じ、24 時間 (a.Exc24hr) で 3.5% 程度、48 時間で 6% 程度まで上昇した。wRBC+Rd 群は輸液剤交換後に上昇へ転じ、6 時間で 30% 程度に達した後