The Japanese Association for Chest Surgery

シンポジウムII

人工血液・安定化ヘモグロビンの臨床使用のための基礎的研究

自治医科大学胸部外科学講座
*1筑波大学臨床医学系
*2土浦協同病院胸部心臓血管外科
蘇原　泰則，村岡　了一*1，村山　史雄，船越　尚哉*2，
森田理一郎*1，木下　朋雄*1，三井　清文*1，堀　　原一*1

要　　旨

安定化ヘモグロビン（polyethylene glycol conjugate of pyridoxylated human hemoglobin または SHb），新鮮血，赤血球浮遊液，FC-43 emulsion をラットの血液と交換し，これらの交換輸血が体肺循環に与える影響を比較検討することによって，安定化ヘモグロビンの臨床使用の可能性を検討した．

赤血球浮遊液による交換では体肺循環はほとんど変化しなかった．新鮮血で交換すると，活性化された白血球や血小板が肺微小血管を傷害し，肺水腫が発生した．FC-43 emulsion による交換では，実験動物全例が低酸素血漿で死亡した．安定化ヘモグロビンによる交換では，体肺循環障害や異常免疫反応は発生せず，むしろ肺微小循環の改善がみられた．

以上より，安定化ヘモグロビンは臨床使用の可能性の高い人工血液であると考えられる．

索引用語：人工血液，ヘモグロビン修飾物質
artificial blood substitute, modified hemoglobin solution

序　　論

人工血液としてのヘモグロビン溶液研究の歴史をみると[1]，まず1947年に Hamilton らが赤血球膜を取り除いただけのヘモグロビン溶液をイヌに静注し，重症の腎障害をまねいた．Rabiner ら[2]はこの原因が赤血球基質によることを知り，基質を除外したヘモグロビン液，即ち stroma free hemoglobin（SFH）を作成し用いた．SFH の問題点は酸素との結合が強すぎて組織で酸素を放出しにくいこと，腎臓からの排泄が早すぎることにある．岩下ら[3]は SFH を pyridoxylate することによって，酸素解離曲線の P_{50} を正常赤血球に近い24 mmHg へと上昇させ，酸素の取り込みや放出を正常化すると同時に，分子量4000の polyethylene glycol を一個のヘモグロビンに平均7個重合させることによって，分子量を平均86000まで増加させ，血中での半減期を14時間まで延長させた（SFH は3時間）．岩下らによって開発されたヘモグロビン修飾物質（polyethylene glycol conjugate of pyridoxylated human hemoglobin，以下安定化ヘモグロビンまたは SHb）はこのように極めて優れた性質を有しており，臨床応用の可能性が極めて高い．

本研究の目的はラットの血液を安定化ヘモグロビンや他の血液材料で交換し，この時の体循環，肺循環さらには肺微小循環を比較検討することによって，安定化ヘモグロビンの臨床使用の可能性を検討することにある．

実験方法

(1) 実験動物の作成：実験動物として体重200～500 g の Wistar 系ラットを用いた．これを

NII-Electronic Library Service

The Japanese Association for Chest Surgery

pentobarbital sodium（1.25 mg/100 g rat weight）と diazepam（0.25 mg/100 g rat weight）の合剤で腹腔内麻酔し，気管切開部より挿管し，pancronium bromide（0.1 mg/100 g rat weight）静注後，Harvard のレスピレーターで換気させた（一回換気量0.5 ml/100 g rat weight, 呼吸数100/min, 終末呼気圧 3 cm H_2O）．次に，右外頸静脈と右総頸動脈にポリエチレンチューブを挿入留置した後，胸骨を縦切開し心臓表面に達し，肺動脈主幹部にポリエチレンチューブを留置した．次に，左胸壁のほぼ全体を切除し，左肺を露出させた．右外頸静脈は輸血や静脈注射に用いた．右総頸動脈は脱血や動脈圧測定や動脈血採血に用いた．肺動脈主幹部は肺動脈圧測定に用いた．

(2) 交換輸血法：右総頸動脈より0.1 ml/min/100 g rat weight の血液を脱血すると同時に，4 種類の交換液（1：SHb[3]，2：FC-43 emulsion[4], 3：Fresh blood, 4：Red blood cell suspension, 各群5匹）を37度Cに加温し，脱血量に等しい量を右外頸静脈より注入した．Fresh blood は heparin sodium（100 u/100 g rat weight）を静注した後採血した全血である．また，Red blood cell suspension は，Fresh blood から赤血球のみをとりだし，5％bovine albumin をヘマトクリット値が40％になるように加えることによって作成した赤血球懸濁液である．なお，蛍光顕微鏡による観察のため，各注入液に分子量156000の 5％FITC-dextran を 5 vol％ の割合で混入させた．

(3) 生体肺微小循環観察法：まず，左胸壁を切除し露出した左肺下部横隔膜面を顕微鏡観察用吸引チャンバーに挿入し吸引固定する．この肺表面を蛍光用大型顕微鏡で観察し，肺微小循環の生体観察を行う．このようにして得られた蛍光肺微小循環像を超高感度 SIT TV カメラ，ビデオタイマー，ビデオレコーダーを通し，モニター画面に約1000倍で映し出し，必要に応じて録画し，解析に用いた[5]．

実験成績

(1) 交換輸血に伴うヘマトクリット値の変動：SHb や FC-43 emulsion は赤血球を含まないため，交換率が増加するにつれてヘマトクリット値が低下した．SHb 群のヘマトクリット値を用いて算出した交換率は20分が50％，40分

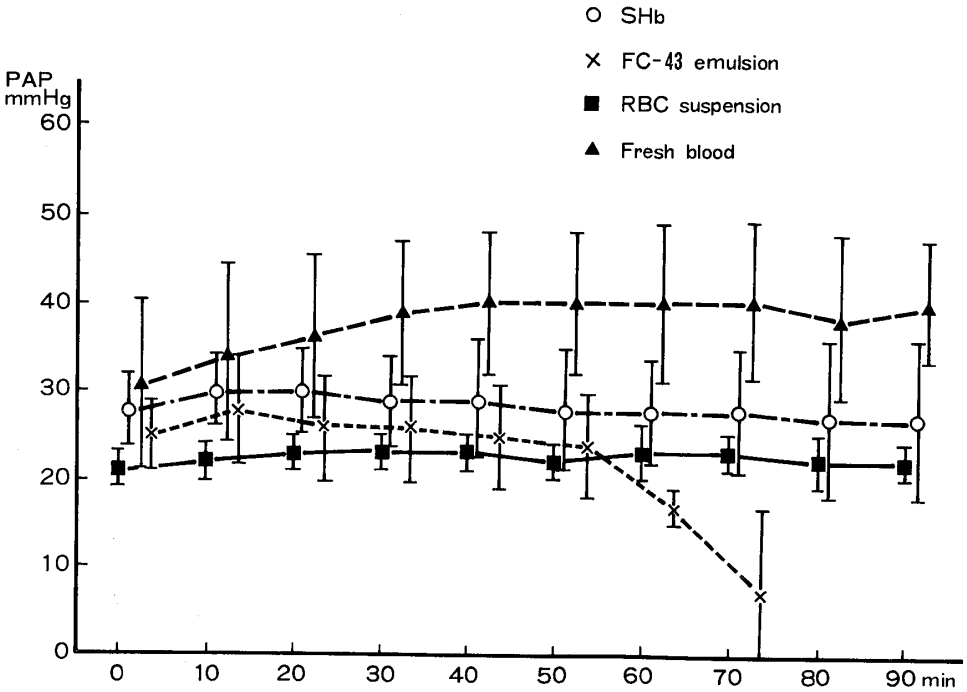

Fig. 1 Pulmonary arterial pressure of the rat during exchange transfusion

NII-Electronic Library Service

The Japanese Association for Chest Surgery

が80%，60分が90%であった．FC-43 emulsion も SHb とほぼ同様の経時的変化を示した．Fresh blood や RBC suspension は赤血球を含むため，ヘマトクリット値に大きな変化はみられなかった．

(2) 交換輸血時の動脈血ガス分析値の変動：Fresh blood では，交換前97 mmHg であったものが60分で83 mmHg へと明らかに低下した．RBC suspension でも 113 mmHg から 90 mmHg へとわずかに低下した．これに反し，SHb では107 mmHg から113 mmHg へとむしろ上昇傾向を示した．また，FC-43 emulsion では，60分まで上昇傾向をみせるものの，以後急激に低下し，全例死亡した．

(3) 交換輸血時の動脈圧の変動：4 群ともに交換輸血前，120 mmHg 前後の値を示した．Fresh blood や RBC suspension では，交換輸血開始後10分で 5 ～10 mmHg の血圧下降をみせるが，漸次上昇し60分で交換輸血開始前とほぼ同時の値にもどった．これに反し，SHb では

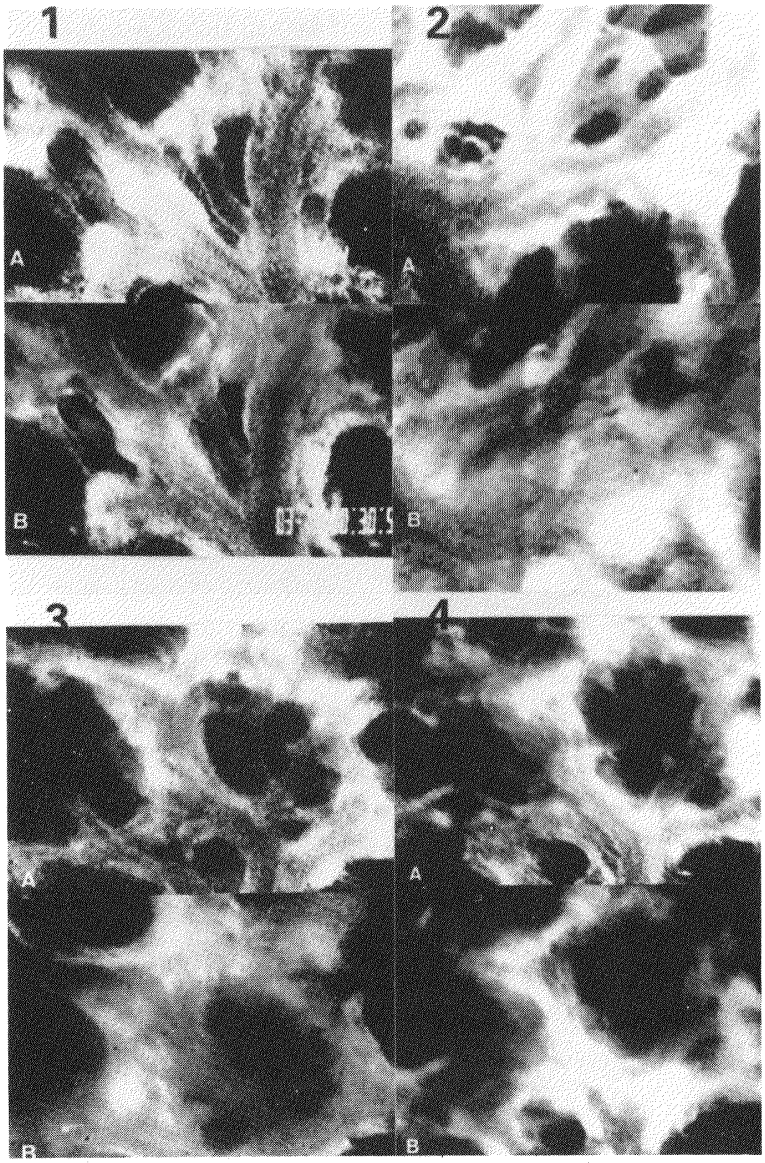

Fig. 2 Pulmonary microcirculation during exchange transfusion
1: RBC suspension, 2: Fresh blood, 3: SHb, 4: FC-43 emulsion, A: before exchange transfusion, B: 70 % exchange transfusion

NII-Electronic Library Service

The Japanese Association for Chest Surgery

むしろ10分後に最高値をとり漸次下降し，60分では交換輸血前より10 mmHg ほど低い値をとった．FC-43 emulsion では交換輸血の開始と同時に血圧の下降が始まり，60分で31 mmHg まで下降し，80分で全例死亡した．

(4) 交換輸血時の肺動脈圧の変動：SHb, RBC suspension では，交換輸血中に肺動脈圧の大きな変動はみられなかった．FC-43 emulsion でも，80～90%交換までは明らかな変化は見られなかった．これに反し，Fresh blood では交換輸血開始時31 mmHg であったものが60分で40 mmHg まで上昇した（Fig. 1）．

(5) 交換輸血後の摘出肺乾湿重量比：90分間交換輸血した後の右肺を摘除し，単純乾燥によって求めた肺乾湿重量比は，RBC suspension が4.78，Fresh blood が8.05，SHb が5.53，FC-43 emulsion が5.19であり，Fresh blood によるものがもっとも高い値を示した．

(6) 交換輸血時の生体肺微小循環像：Fig. 2 は蛍光生体肺微小循環像で，Aは交換輸血前，Bは70%交換時の像である．これらは全て肺毛細血管から肺細静脈にかけての像で，交換輸血前の微小血管は静注した FITC-dextran によって鮮明に白く描出されており，循環障害像や血管傷害によっておこされる血管外への FITC-dextran の浸出は全く見られない．像 1-B は RBC suspension によるもので，肺微小血管での循環障害や血管傷害は全く見られない．像 2-B は Fresh blood によるものであるが，血管内膜に白血球系細胞が付着し，血流速度の低下もみられる．また，血管外へ FITC-dextran が多量浸出することによって，血管内はむしろ黒く描出されている．像 3-B は SHb によるもので，低分子量血漿成分の血管外への漏出がわずかにみられるが，血流速度はむしろ上昇する傾向をみせた．像 4-B は FC-43 emulsion によるものであるが，明らかな循環障害や血管障害は見られない．

考　　察

SHb 液による交換輸血では，肺細静脈から低分子量血漿成分のわずかな漏れがみられ，肺乾湿重量比もわずかに増加した．しかし，肺動脈圧は変化せず，動脈血ガス分析値も良好な成績をしめしたことから，SHb 液は血管傷害をおこさないものと考えられる．定性的ではあるが，肺微小血管血流速度が上昇しており，SHb 液には微小循環改善作用があるものと思われる．赤血球は血液の粘性を増加させるばかりでなく，時に微小血管内で rouleaux をつくり微小循環障害の原因となる．また白血球や血小板は微小血管内に付着したり，血栓をつくることによって循環障害をおこす[6,7]。従って，血球成分が SHb 液によって交換され減少したことによって微小循環が改善したものと思われる．一方，正常の血液が SHb 液で交換されると，当然のことながら血液凝固成分も低下し，出血傾向が生ずる．交換輸血後半に手術創からみられた出血は血液凝固成分の減少によるものと思われる．また，本実験ではヒト赤血球から作成した SHb 液でラットの血液を交換したが，異種蛋白注入に際してみられるような異常免疫反応は全くみられなかった．

以上，安定化ヘモグロビンは免疫学的異常反応を引き起こさず，酸素運搬能に優れ，血管傷害作用もすくなく，むしろ微小循環改善作用があることなどから，臨床応用の可能性の極めて高い人工血液と思われた．

本実験のため安定化ヘモグロビンを提供してくださった，味の素株式会社中央研究所，岩下雄二氏に深謝します．

文　　献

1) 簑島　高：人工血液．医学書院，東京，1986.
2) Rabiner SF, Helbert JR, Friedman LH: Evaluation of a stroma free hemoglobin solution for use as a plasma expander. J Exptl Med **126**: 1127-1142, 1967.
3) Iwashita Y, Iwasaki K, Ajisaka K, et al: Use of a new oxygen-carrying blood substitute, Progress in Artif. Organs, pp. 867-870, 1983.
4) The Green Cross Corporation: FC-43 Emulsion. Technical Information Ser. No 3, 1976.
5) 蘇原泰則，三井清文，堀　原一，他：蛍光法を用いたラット肺微小循環の生体顕微鏡による観察．脈管学 **27**：113-120，1987.
6) Sohara Y, Hori M, Wildevuur RH, et al: Effect of endotoxin on pulmonary microcir-

NII-Electronic Library Service

The Japanese Association for Chest Surgery

culation. Microcirculation annual 1988, NIHON - IGAKUKAN, pp. 63-64, Tokyo, 1988.
7) Sohara Y, Hori M, Mitsui K, et al : Effect of fresh blood transfusion on pulmonary microcirculation. Microcirculation annual 1989, NIHON - IGAKUKAN, pp. 69-70, Tokyo, 1989.

The basic study of stabilized hemoglobin for clinical use as artificial blood substitute

Yasunori Sohara, Ryoich Muraoka[*1], *Fumio Murayama, Naoya Funakoshi*[*2], *Riichirou Morita*[*1], *Tomoo Kinoshita*[*1], *Kiyofumi Mitsui*[*1], *Motokazu Hori*[*1]

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Jichi Medical College
[*1]Institute of Clinical Medicine, Tsukuba University
[*2]Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Tsuchiura Kyodo Hospital

We examined the effects of polyethylene glycol conjugate of pyridoxylated human hemoglobin (SHb) to systemic and pulmonary circulation of the rat by using exchange transfusion between rat blood and SHb. The results were compared with the same experimental results by fresh blood, red blood cell suspension and FC-43 emulsion.

Systemic and pulmonary circulation were not changed when the rat blood was exchanged by red blood cell suspension. Pulmonary microvascular injury occurred when fresh blood was used. All rats exchanged by FC-43 emulsion were dead by hypoxia. The rats examined by SHb did not have any abnormal immune reaction and pulmonary microvascular injury. We could see improvement of pulmonary microcirculation.

It may be concluded that SHb is one of the most eligible candidate for artificial blood substitute.

NII-Electronic Library Service