

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09300

研究課題名（和文）切断四肢保存のための人工赤血球灌流療法の開発

研究課題名（英文）Development of Ex-vivo Perfusion Therapy with Artificial Oxygen Carrier for Amputated Limb Preservation

研究代表者

四宮 陸雄（Rikuo, Shinomiya）

広島大学・医系科学研究科（医）・寄附講座准教授

研究者番号：80581454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：四肢切断を生じた場合、筋組織が阻血に弱いため超早期に血行再建術が行われなければ四肢の重篤な機能不全が残ることが課題となっており、血行再建まで切断四肢を保存する方法の開発が望まれる。切断四肢を長時間保存する方法として血液による四肢灌流療法の基礎研究が行われている。血液には血液型適合性、感染症リスク、在庫問題などがあり、人工赤血球はこれらの問題を克服するために開発された。本研究において、ラットの血液を使用した体外灌流モデルの至適灌流条件の確立を行った。このプロトコルを用いて、本邦で臨床応用に向けて研究が進められている、人工赤血球のさらなる有効性を明らかにできる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性四肢切断は緊急性が極めて高い病態であるが、血管吻合技術を有する医師の数は少なく、重症例では生命維持が優先されることなどの要因もあり、血行再建術を完遂することは困難を極める。また、昼夜を問わず緊急手術で対応する必要があり、医療従事者の疲弊が最大の問題となっている。これらの問題は、時間的な猶予がないことに起因するものであり、再接着術までの間、切断四肢を長時間保存できる方法の開発が期待されている。「切断四肢の保存」が可能となれば患者と医療従事者の双方にとって益することが多大である。本研究で確立したプロトコルは、温存の体外療法の基礎研究レベルでの至適条件の検討に有用である。

研究成果の概要（英文）：When limb amputation occurs, the muscle tissue has poor tolerance to ischemia, and immediate revascularization surgery is necessary to prevent severe functional impairment. It is critical to develop methods to preserve the amputated limb until revascularization surgery. Basic research has explored ex-vivo perfusion therapy using blood to extend the preservation time of amputated limbs. However, allogeneic blood transfusion faces challenges such as blood type compatibility, infection risk, and supply problems. Artificial oxygen carrier was developed to solve these problems. In this study, we established the optimal perfusion conditions using an ex-vivo rat hind-limb perfusion model with blood. This protocol can further elucidate the efficacy of artificial oxygen carrier, which are being researched for clinical application in Japan.

研究分野：四肢外傷再建

キーワード：四肢切断 体外灌流 人工赤血球 温度 四肢外傷再建 骨格筋

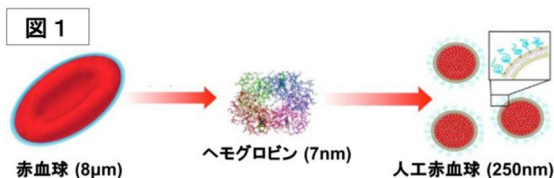
1. 研究開始当初の背景

四肢切断治療の現状

四肢切断は労災事故などの外傷で生じる重度外傷である。切断後、阻血に最も弱い筋肉は 4 時間程度で不可逆性の壊死に陥るため、血管吻合を必要とする血行再建術が受傷から 4 時間以内に行われなければ、その四肢機能損失は多大なものとなる (Glass C et al. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2009)。緊急性が極めて高い病態であるが、血管吻合技術を習得して血行再建術が行える医師の数は少なく、重症例では生命維持が優先されることなどの要因もあり、実際に受傷から 4 時間以内に血行再建術を行うことは困難を極める。また、昼夜を問わず緊急手術で対応する必要があり、関係する医師やコメディカルの疲弊が最大の問題となっている。これらの問題は「時間的な猶予がない」ことに起因するものであり、再接着術までの間、切断四肢を長時間保存できる方法の開発が期待されている。「切断四肢の保存」が可能となれば患者と医療従事者の双方にとって益することが多大である。

切断四肢に対する組織灌流療法

近年、切断四肢を長時間保存する方法として血液による四肢灌流療法が注目されている。四肢の体外灌流は基礎研究レベルであり、至適灌流条件は確立していない。そこで、申請者は「切断四肢の保存」を目的に日本白色家兔の自家血液を用いた灌流療法の開発を行った (整形災害外科学研究助成財団助成)。これは補助循環装置を用いて血液などの灌流液を使用するものであるが、多量の赤血球が必要な上、グルコースやステロイドも負荷しなければならない (Duraes EFR et al. Microsurgery 2017, Ozer K et al. J Hand Surg Am 2016)。しかし、臨床の重度外傷例において自己血液を使用することは困難であり、同種血液を使用する場合は在庫の問題、血液型適合性の問題、感染症の問題もあり、血液を用いた灌流療法は臨床現場では現実的ではない。そこで本研究では、研究分担者の酒井らが開発した人工赤血球を用いることとした。この人工赤血球は高濃度ヘモグロビン溶液を脂質二分子層膜で被覆 (Hb 小胞体; 直径 250nm) したもので、血液製剤と比較して、血液型適合性を必要としない、感染症を生じない、約 2 年間の常温保存可能などの有用性をもつ。また、赤血球に比べてサイズが小さいため、低酸素領域への高い酸素運搬機能を有する (図 1)。また理論上、脂質二分子層膜構造内への薬剤添加によるドラッグデリバリーにも使用可能である。



miRNA-1, miRNA-133, miRNA-206 と筋再生

マイクロ RNA は 18 ~ 25 塩基長の小さな一本鎖 RNA で、タンパク質に翻訳されないが、メッセンジャー RNA (mRNA) の発現や、mRNA からタンパク質への翻訳を制御することで機能している (図 2)。本研究では miR-1, miR-133, miRNA-206 に着目する。申請者らはこれら 3 つの miRNA が骨格筋の成熟、分化、恒常性の維持に協力的に作用する報告をしている (Nakasa T et al. J Cell Mol Med 2010)。上記の知見から、本研究の学術的な「問い」として、人工赤血球の灌流が四肢切断組織の長時間の保存を可能し、さらに人工赤血球を用いた miR-1, miR-133, miR-206 の筋組織へのデリバリーで良質な骨間筋を担保した保存療法が開発できるのではないかと考えた。

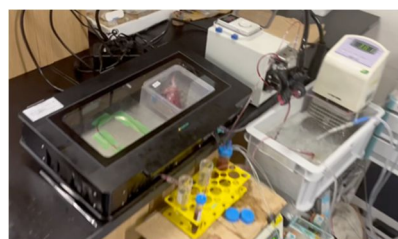
2. 研究の目的

本研究では、切断四肢の保存を目的とした人工赤血球灌流療法を開発することを目的とした。また、筋組織の恒常性維持に有益なマイクロ RNA を人工赤血球でデリバリーした際の骨間筋に対する相乗効果も明らかにすることも目指した。申請者らが研究を行ってきた人工赤血球や、骨格筋におけるマイクロ RNA の知見を活かした研究であり、独自性と創造性があると考えた。

3. 研究の方法

申請者は「切断四肢の保存」を目的に四肢灌流デバイスを自己作成し日本白色家兔の自家血液を用いた灌流療法の開発を行ってきた (整形災害外科学研究助成財団助成) が、日本白色家兔では人工赤血球の使用できる量や、閉鎖式回路作成が困難であったため、動物サイズを縮小しラットの切断後肢に対する灌流療法を開発することとした (図 2)。これを用いて灌流モデルの至適条件を探り、その後、自家赤血球と人工赤血球による骨間筋保存効果の比較を行い人工赤血球の有用性を検討した。12 時間の体外灌流時間を行い、体外灌流における主要な副作用である浮腫の程度を主要評価項目とした。副評価項目として、体外灌流の 1 時間毎の血液ガス分析、灌流液の溶血、クレアチンキナーゼ、浸透圧を測定した。また、12 時間後の筋組織の 4sample の採取を行い、先行研究に準じて組織の評価を行った。

図 2



4. 研究成果

当初3カ年に以下のことについて検討することを計画した。

令和3年度：ラット骨間筋灌流モデルを作成し自家赤血球と人工赤血球による骨間筋保存効果の比較を行い人工赤血球の有用性を検討する。

令和4年度：miRNA-1, miRNA-133, miRNA-206を人工赤血球に添加し、骨格筋の保存効果を検討する。

令和5年度：臨床応用を目指し最適化された人工赤血球灌流療法をラット切断後肢に行う。その後、血行再建術を行い筋組織や四肢機能に与える影響を評価する。

しかし、赤血球を使用した体外灌流の主なトラブルである溶血のコントロールに時間を要し、当初の計画より遅れが生じた。3カ年で、ラットの自家および同種血を使用した灌流モデルの至適灌流条件の設定と、それと人工赤血球の灌流モデルの有用性の検討まで行った。

自家及び同種血体外灌流モデル

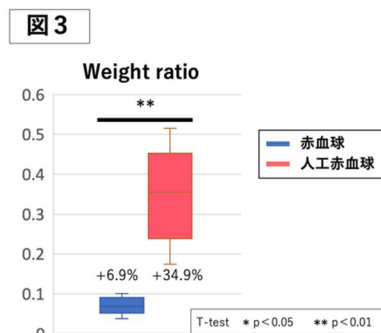
血液量の過小と、同種血の混合による溶血の回避を目的に、雌のSDラットから雄のLewisラットに変更し、以下のプロトコルを確立した。ラットを麻酔下に全採血を行い、屠殺する。血液はヘパリンと混和の上、輸血用チューブのろ過網を通し凝血塊を除去する。血液を1000Gで30分間、遠心分離して白血球・血小板層のみをマイクロピペットで可及的に除去する。血液を5%アルブミン付加した生理食塩水で希釈し、終濃度をヘマトクリット10%でとなるよう調整し、ステロイドを付加し、50mlを用意する。ラットは左後肢を切断し、大腿動脈に外径0.64mmの専用チューブを挿入固定し、専用チャンバー内に置く。灌流回路は閉鎖回路とし、灌流液を貯留したリザーバーからローラーポンプ、専用人工肺、専用チャンバー、リザーバーへと戻るように設置する。灌流前の切断後肢の平均重量をもとに、灌流速度は1ml/分とする。灌流液にヘパリン、ブドウ糖、インスリン、炭酸水素ナトリウムを定量で持続投与する。灌流回路は腎臓・肝臓に当たる排泄機能を有していない。自己血を用いた灌流液はローラーポンプの機械的刺激による赤血球の溶血と制御困難なカリウムの増加を来す。特に遊離ヘモグロビンは血管の内皮障害により浮腫を来す。これによる影響を抑えるために、12時間の灌流時間を3時間毎に区切り、同種血を用いた新しい灌流液に交換する。新しい灌流液は他のラットから調達・作製する。静脈血は60分毎に血液ガス分析検査を行い、電解質、乳酸値、酸素化などを確認する。3時間毎に廃棄される灌流液から生化学検査(クレアチンキナーゼ)、浸透圧、溶血を確認する。副作用である浮腫の程度を評価すべく、灌流前後の下肢重量から増加比(灌流後重量/灌流前重量-1)を計測した。組織学的評価として、前脛骨筋と腓腹筋内側頭から4sampleを採取し、4%パラホルマリンで浸漬固定の上でパラフィン切片を作製し、過去の報告に従い、筋肉の虚血損傷の程度を評価する。

自家及び同種血体外灌流モデルでの温度条件の比較

上記プロトコルで、温度条件の違いで2群を作製し比較した。実験室室温環境(24-26度)の室温群と、ラットの体温に近づけるため38度設定の加温機でチャンバーと人工肺を加温した加温群をn=8ずつ作成した。浮腫のweight ratioは、室温群 $6.9 \pm 2.2\%$ 、加温群 $33.6 \pm 12.9\%$ で、室温群の方が有意に抑えられており、組織学的にも損傷が少ない傾向であった。過去の研究と同一条件は一つとしてないが、室温群の浮腫の程度は遜色ない程度まで抑えられていた。室温群の自家および同種血を使用した灌流条件として、室温環境下の方が適していると判断した。

自家及び同種血体外灌流モデルと、人工赤血球体外灌流モデルの比較

上記温度条件を固定して灌流液の比較をするために、上記の同種血の実験室室温(24-26度)の同種血群n=8の対照群として、人工赤血球群n=5を設定した。温度以外も、各種パラメータや、希釈するアルブミン5%を付加した生理食塩水も同一とし、血液部分を人工赤血球で置換した。使用する人工赤血球は250nm程度で赤血球と比較して圧倒的に小さく、通常遠心で沈降しない。故に赤血球体積やヘマトクリットに対応する数値がないため、Hb値を統一した。浮腫のweight ratioは、同種血群 $6.9 \pm 2.2\%$ 、人工赤血球群 $34.9 \pm 12.8\%$ で、浮腫としては同種血が抑えられていた(図3)が、一方で、嫌気性代謝の乳酸値は人工赤血球が抑えられており、相反する結果となった。浸透圧が同等ではなく、人工赤血球のほうが低かった。提供される人工赤血球には膠質浸透圧がない。人工赤血球の急性失血モデルの研究では別途アルブミンを投与している。体外灌流における赤血球と人工赤血球の正確な比較には浸透圧を同等に調整する必要があり、浸透圧調整後の人工赤血球は体外灌流において赤血球より優れる可能性もあると考える。



今後、浸透圧調整後の人工赤血球群を作成し、研究を継続予定である。

Duraes EFR et al. Microsurgery 2017
Ozer K et al. J Hand Surg Am 2016
Kruit AS et al. J Surg Resea 2018
Kruit AS et al. Transplant International 2021
Sakai H et sl. Current Medicinal Chemistry 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横田 巖 四宮 陸雄 石橋 栄樹 林 悠太 安達 伸生
2. 発表標題 ラット切断肢の体外灌流における温度条件の違いの検討
3. 学会等名 第40回中部日本手外科研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横田 巖 四宮 陸雄
2. 発表標題 ラット骨格筋保存を目指した体外灌流の試み
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 栄樹 四宮 陸雄 横田 巖 林 悠太 安達 伸生
2. 発表標題 ラットモデルでの四肢切断の体外灌流プロトコールの作製
3. 学会等名 第66回 日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横田 巖 四宮 陸雄 石橋 栄樹 林 悠太 安達 伸生
2. 発表標題 ラット切断肢の体外灌流における温度条件の違いの検討
3. 学会等名 第66回 日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横田 巖 四宮 陸雄 石橋 栄樹 林 悠太 安達 伸生
2. 発表標題 ラット切断肢の体外灌流における温度条件の違いの検討
3. 学会等名 第38回 日本整形外科基礎学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横田 巖 四宮 陸雄 石橋 栄樹 林 悠太 安達 伸生
2. 発表標題 ラット切断肢の体外灌流における赤血球と人工赤血球の比較
3. 学会等名 第67回 日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	酒井 宏水 (Sakai Hiromi) (70318830)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	味八木 茂 (Miyaki Shigeru) (10392490)	広島大学・病院(医)・特定教授 (15401)	
研究分担者	中佐 智幸 (Nakasa Tomoyuki) (60467769)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------