

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K10521

研究課題名(和文)呼吸停止時の人工赤血球の有用性の検討

研究課題名(英文)Effects of HbV during Apnea situation

研究代表者

内藤 祐介(Naito, Yusuke)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：00623498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヘモグロビン小胞体(HbV)による低酸素血症改善効果の検討について実施した。2015年度には換気停止モデルが存在しなかったため、ラットにおけるモデル確立を行った。2016-2017年度では、上記結果を用いて本実験を実施した。結果として、HbV群は循環虚脱までの時間が有意に上昇し仮説が証明された。2018年度は、HbVの投与量の調整によりさらなる延長が見込めるか否かについて実験を実施した。しかし、結果は容量を増加させても同程度の延長しか見込めず予備実験を持って終了した。最終年度は蘇生されたラットの行動実験を実施し、長期予後に与える影響について組織標本を用いて検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔導入時に稀ではあるが重大な合併症として知られる換気困難、挿管困難時には低酸素血症が生じうる。低酸素血症はやがて循環虚脱を引き起こし、患者に重大な影響を与える。このような状況下では気管切開や補助心肺装置の使用が考慮されるが、いずれの処置も短時間で施行可能ではないため、これらの処置中に患者の酸素化を行う補助手段が必要となる。ヘモグロビン小胞体は人工赤血球の一種であり、静脈内に投与可能である。今回我々の実験により、ヘモグロビン小胞体を静脈内投与することで酸素化が一時的に維持可能であることが証明された。これにより、低酸素血症時に新たな治療オプションが加わるようになることが見出された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of hemoglobin vesicles (HbV) on improving hypoxemia. Since there was no established apnea model of rats in 2015, we conducted a preliminary experiment to establish apnea model in rats. In 2016-2017, we conducted the main experiment using the above preliminary study model. As a result, the hypothesis was proved by improvement of significantly increasing the time to circulatory collapse in HbV group. In 2018, we conducted an experiment to evaluate if further extension can be expected by adjusting the HbV dose. However, the extension times were comparable among groups even if the capacity was increased, and ended with preliminary experiments. In the final year, behavioral experiments of resuscitated rats were conducted, and the effects on long-term prognosis were examined using tissue samples.

研究分野：麻酔科学, 集中治療

キーワード：ヘモグロビン小胞体 低酸素血症 呼吸停止

## 1. 研究開始当初の背景

換気不全は、低酸素血症、高二酸化炭素血症を引き起こし極めて短期間で生命が脅かされる重篤な病態である。循環動態が維持されているにも関わらず、換気が中断される原因は腫瘍、血腫などによる機械的換気中枢の圧迫、急性喉頭蓋炎や気管異物などによる閉塞性障害、肺塞栓などによる V/Q ミスマッチなどが存在する。換気不全時には、その病態に応じて経口挿管、異物除去、経皮的心肺補助装置(Percutaneous Cardiopulmonary Support; PCPS)などが実施されるがこれらの治療法は熟練した医師が行った場合においても、準備から施行までに時間がかかる手技である。一方、低酸素血症は脳障害、心筋虚血など二次的合併症を直ちに引き起こすため、換気不全時は速やかな対応が必要となる。

ヘモグロビン小胞体 (Hemoglobin Vesicle; HbV) は高純度・高濃度のヘモグロビンを脂質分子二層膜で包んだ小胞体である。原料のヘモグロビンは検査済みの献血由来の有効期限切れの赤血球由来であるが精製過程で遠心分離、フィルタリング、加熱の行程を経ることにより感染の危険がない製剤である。また赤血球膜が除去されているため、血型が存在せずクロスマッチなどの検査も必要ない。室温においても長期間安定した状態であり、必要な時にすぐに使用可能であるというメリットが存在する。また HbV は脱酸素状態で保存されるが、シリンジ内などで空気と接触させることにより速やかに酸素化が可能である。換気不全時に、HbV を静脈内投与することにより酸素化が維持された場合、挿管、PCPS など現行の治療が確立される間までの橋渡しが可能となり、有用であると考えられた。

## 2. 研究の目的

上記、仮説を証明するために5年間の間に複数の実験を実施した。2015年当初ラットを対象とした換気不全モデルが複数存在したものの、その多くは平均血圧を用いてエンドポイントを設定したものであった。しかしながら、我々の実験系では静脈内に血圧上昇を無視できない容量負荷を実施するため、新たなモデルの作成が必要となった。そのため、2015年には脈圧をエンドポイントとして用いた新たな換気不全モデルの確立を目的として実施した。2016年よりは、このモデルを用いて、ヘモグロビン小胞体投与がそのほかの薬剤投与群もしくは、薬剤無投与群と比較して循環虚脱までの時間の有意な延長が見込めるかを検証することを主目的として実施した。2018年度よりはさらなる延長効果を期待してヘモグロビン小胞体による循環虚脱までの時間が容量依存性に増加するかの検討を実施した。最終年の2019年度には、ヘモグロビン小胞体を投与した群の長期的予後について検討するため、ラットに蘇生処置を行い、組織学的な変化および行動実験による評価を行うことを目的として実験を実施した。

## 3. 研究の方法

全ての研究は10週齢オス、300-330gのSDラットを用いて実施した。全ての実験系に共通する項目についてはまずは記載し、その後個別の実験特有の方法について記載する。

### < 共通する実験手順 >

全ての動物は12時間サイクルの照明下、水、飼料へは自由摂食可の専用施設で管理した。実験開始時には、イソフルラン5%付加した酸素5L/minを流した専用チェンバー内にラットをおき麻酔を導入した。その後、14G静脈留置針の外套を用いて気管挿管を実施し、小動物用人工呼吸器(Harvard Model 683, HARVARD APPARTUS, MA, USA)に接続し酸素1L/min, 空気1L/minにイソフルラン1.0-1.5%を負荷し麻酔を維持した。

麻酔が安定していることを確認したのち、尾動脈にポリエチレン製のカテーテルを挿入し動脈圧ラインとしてモニタリングを行った。その後右外頸静脈を露出し、同様にカテーテルを挿入し静脈ラインとして用いた。

### < 予備実験 >

予備実験では5匹のラットを用いて、循環虚脱の指標について検討を行った。すなわち、上記共通手順に従い麻酔を実施したのち、ロクロニウム1mg/kgを投与し自発呼吸が消失したことを確認したのち、人工呼吸器を止めた。その後動脈圧ラインをビデオにて撮影し、収縮期血圧、平均血圧、脈圧、心拍数のそれぞれの推移について記録を行った。記録の結果、それぞれの指標における平均値および標準偏差を算出し変動係数(標準偏差/平均値)がもっとも低い指標を循環虚脱の定義として今後用いることとした。

### < 本実験 >

予備実験の結果を用いて、本実験ではラット24匹をランダムに4群に分類し実験を施行した。4群はAir群, Oxy群, NS群, HbV群として割り付けた。Air群は上記の共通実験手順を実施後、酸素流量を0とし空気のみで十分な換気を実施したのち、ロクロニウムを投与し換気を停止させた。一方、残りの3群においては全て100%酸素で換気を行ったのち、同様にロクロニウムを投与した。換気停止中にはAir群, Oxy群では薬剤の投与を実施しなかったのに対してNS群では6mLの生理食塩水を、HbV群では6mLの酸素化されたヘモグロビン小胞体を投与した。上

記4群において脈圧が20mmHgを下回るまでの時間（PP20）を計算した。

<第2実験>

本実験によりヘモグロビン小胞体を投与することにより循環虚脱までの時間が延長することが判明した。また、延長時間は約60sであり、ラットの酸素消費量がヒトの成人の約7倍であることを考慮するならば、臨床的には約7分の時間的延長が見込めることが判明した。一方でクリニカルシナリオであるCVCII時には気管切開やPCPSなどが施行されるがいずれの場合においても7分では施行が不可能であることが多い。そのため、第2実験ではHbV投与量を調整することによりさらなる時間的延長が見込めるかどうかを主眼に実験を行った。

第2実験では16匹のラットを用いて実験を行う予定とした。共通手順に従いラットを麻酔したのち、あらかじめランダムに4群に割り振っておいたラットに対して酸素化されたHbVをそれぞれ3mL, 6mL, 9mL, 12mL投与する予定とした。仮説では容量依存的に循環虚脱までの時間が延長することが期待された。

<第3実験>

最終年度には、ヘモグロビン小胞体投与後に蘇生したラットの長期アウトカムについて検討を行った。すなわち、臨床的には低酸素血症に遭遇した場合、低酸素血症の治療と並行して蘇生処置がACLSなどのガイドラインに沿って施行される。蘇生が可能であった症例に関しては、その後治療経過に応じてリハビリ、社会復帰へと進むがこの際、低酸素血症に暴露されたことによる脳障害が大きな弊害となりうる。そのため、本実験では第一実験と同様に換気を停止させ、薬剤の投与を行ったのち、4分後に換気を再開させつつ胸骨圧迫、アドレナリンの投与などを行い、ラットに対して蘇生を行った。その後、循環の回復が認められた個体に関しては抜管し、翌日より脳高次機能評価としてモリス水迷路試験を実施し、7日目に脳組織標本を作成し海馬における錐体細胞の生存率をカウントした。

4. 研究成果

<予備実験>

予備実験の結果を下記に記す

Blood pressure (mmHg)		asphyxial time (s)		
		Mean	S.D.	CV
SBP	30	100.6	40.1	0.39
	25	113.8	42.1	0.36
	20	123.8	38.2	0.30
MAP	20	122.6	39.2	0.31
	15	143.8	33.9	0.23
	10	192.3	68.6	0.35
PP	25	26.6	7.9	0.29
	20	39.4	7.2	0.18
	15	46	9.4	0.20
	10	68.8	37.9	0.55
	5	78.8	41.2	0.52

SBP, systolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; PP, pulse pressure. Data are shown in seconds. PP 20 mmHg had the lowest CV (Coefficients of variation) and was used to define cardiovascular arrest in subsequent experiments. All rats (n = 5) were mechanically

ventilated with room air at 1L/min and oxygen at 1L/min to maintain  $FIO_2 = 0.6$

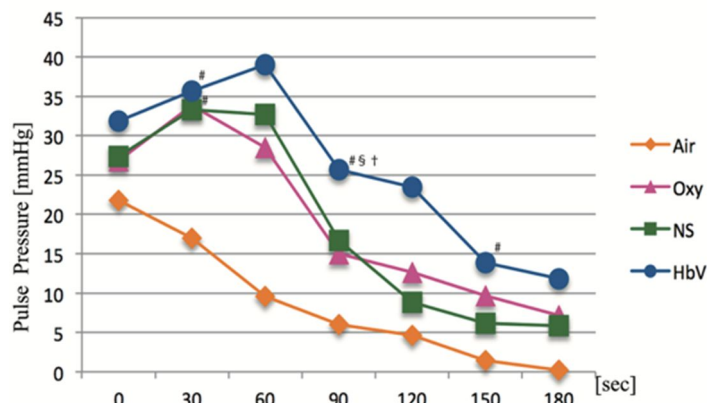
もっとも変動係数が低かったのは脈圧(収縮期血圧 拡張期血圧)であったため、その後の実験系において脈圧(Pulse Pressure; PP)が 20mmHg を下回った時点を経環虚脱として定義した。

< 本実験結果 >

本実験により、循環虚脱までの時間は Air 群でもっとも早く、ついで Oxy 群、NS 群、HbV 群という結果となった。循環虚脱までの脈圧の時間経過について図 1 に、あらかじめ定義した循環虚脱までの各々の群での時間平均について図 2 に示した。

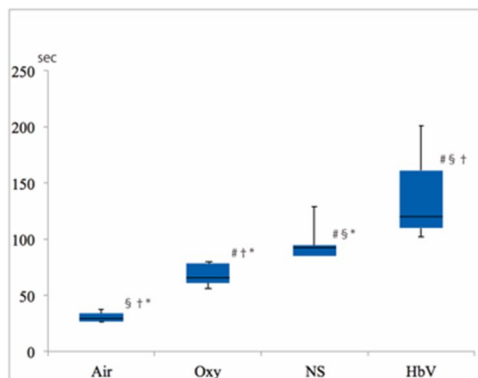
これにより、ヘモグロビン小胞体を投与することにより循環虚脱までの時間が有意に延長することが判明した。

図 1 : 換気停止から循環虚脱までの脈圧の推移



Air 群以外の全ての群において、換気停止後約 30s は急激な脈圧の上昇を認める(交感神経系賦活化による影響と推測される)。その後、経時的に脈圧は減少していくが、中でも HbV 群は長時間に渡り循環を維持可能であった。

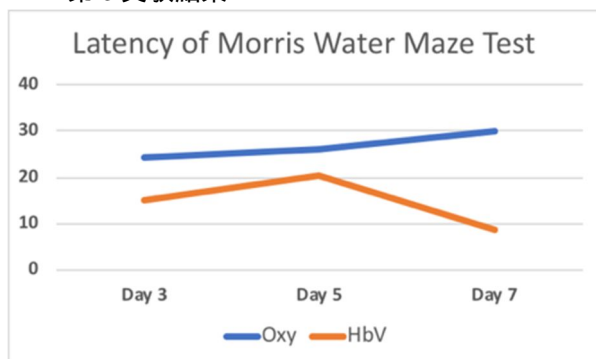
図 2 : 脈圧<20mmHg (循環虚脱の定義) となるまでの時間



< 第 2 実験結果 >

HbV 投与が容量依存的に循環虚脱までの時間を延長するかを検討した。しかしながら、3mL, 6mL, 9mL の 3 匹施行した時点で有意な容量効果が認められないことが判明した(3mL: 50s, 6mL: 55s, 9mL: 45s)。HbV による酸素化維持が容量負荷による心収縮力低下に相殺されることが示唆されたため、予備実験を持って同検討は終了した。課題として、容量を抑えつつ濃度を上昇させることでより有意な時間延長を行うことを検討したが、現在の製造過程では複雑化することから、同検討は他の課題終了後に行うこととなった。

< 第 3 実験結果 >



モリス水迷路試験結果を左記に記す。ラットが透明に隠された逃避台に昇るまでの時間を縦軸にとっている(すなわち、値が小さいほど高次機能が保たれ予後が良いことが示唆される)。結果より HbV 群の方が latency が短い結果となったが有意な差は認めなかった。これは、予測より蘇生率が低下しており、有効なサンプルサイズが得られなかったことも一因として挙げられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naito Yusuke, Sakai Hiromi, Inoue Satoki, Kawaguchi Masahiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Hemoglobin Vesicles prolong the time to circulatory collapse in rats during apnea	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 44-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12871-017-0338-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内藤祐介
2. 発表標題 換気停止時の人工赤血球投与で循環虚脱までの時間が延長する
3. 学会等名 日本麻酔科学会総会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Yusuke Naito, Hiromi Sakai
2. 発表標題 Hemoglobin Vesicles prolong apnea time to circulatory arrest
3. 学会等名 7th International Symposium on Blood Substitutes & Oxygen Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2019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	井上 聡己  (Inoue Satoki)  (50295789)	奈良県立医科大学・医学部・病院教授    (24601)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	川口 昌彦  (Kawaguchi Masahiko)  (60275328)	奈良県立医科大学・医学部・教授    (24601)	
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)	