

低ヘマトクリット条件下の脳に対する Fluorocarbon (Fluosol-DA) の効果

第1報：高度脱血交換犬を用いた研究

京都大学医学部脳神経外科学教室（主任：半田肇教授）

長 沢 史 朗, 鳴 尾 好 人, 織 田 祥 史
村 田 高 穂, 半 田 肇

〔原稿受領：昭和54年8月28日〕

Efficacy of Fluorocarbon (Fluosol-DA) on brain in low hematocrit conditions. Part 1 : Study on severely hemodiluted dogs by exchange transfusion.

SHIRO NAGASAWA, YOSHITO NARUO, YOSHIFUMI ODA,
TAKAHO MURATA and HAJIME HANDA

Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School, Kyoto, Japan

The efficacy of fluorocarbon (Fluosol-DA) as an erythrocyte substitute was studied on severely hemodiluted dogs by exchange transfusion. Twenty five beagle dogs were anesthetized under controlled respiration with partial arterial oxygen tension (PaO_2) kept between 400 and 600 mmHg. Dogs were bled at the rate of 1 ml/kg/min from the femoral artery and simultaneously infused with Fluosol-DA 35% (FDA-35 group), Fluosol-DA 20% (FDA-20 group) and Lactated Ringer's solution (control group) respectively, until a hematocrit value of 1 - 6 % was reached. After one to five-hour observation at this condition, drip infusion of heparinized autologous blood was done in a dose of 40 ml/kg. Arterial blood pressure, electrocardiogram and electroencephalogram were monitored throughout experiments. CT scan, autopsy and histological examinations were performed two to three months after exchange transfusions. The results obtained are :

1. There was marked difference in the survival rate of each group. FDA-20 group had the highest survival rate of 100%, while those of control and FDA-35 groups reached only 25%, 40% respectively.

Key words : Erythrocyte substitute, Oxygen carrying capacity, Exchange transfusion, Electroencephalogram, Ventricular dilatation.

索引語：人工血液，酸素運搬能，脱血交換，脳波，脳室拡大。

Present Address : Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

2. Electroencephalographic changes e. g. slow waves and low amplitude were observed at the hemodiluted conditions. The incidence of these changes was lower in FDA-20 group (17%) compared with those in FDA-35 group (53%) and the control one (100%).

3. Some of the long-surviving dogs showed a ventricular dilatation possibly attributable to a brain atrophy. The incidence of ventricular dilatation well agreed with that of the electroencephalographic changes. Optical microscopic abnormalities, however, could not be noted even in the cases of ventricular dilatation.

4. Fluosol-DA, especially FDA-20, was therefore considered to be much more effective to prevent the brain from hypoxia compared with Lactated Ringer's solution in the severely hemodiluted conditions.

1. 序 論

輸血用血液の不足、輸血時合併症の防止、中程度出血に際しての one bottle transfusion、極端な場合には宗教上の理由から人工血液が必要とされる場合は稀ではない。これら人工血液として、Burk ら¹⁾は、cobalt histidine complex による合成ヘモグロビンを、大村ら⁶⁾は赤血球の microcapsule 化を試みたが、いずれの場合も不安定成分や酸素運搬能の不足、異物反応などの諸問題のため実用化には到らなかった。

1966年 Clark²⁾は fluorocarbon の1種である per-fluorobutyltetrahydrofurane (FC-75) の液中呼吸でマウスを生存させることに成功し、FC-75が水に比較して約50倍の、またヘモグロビンに比較して数倍の酸素運搬能を持つことを明らかにして、fluorocarbon の人工血液としての有効性を示唆したが本邦でも内藤⁴⁾により人工血液開発の経緯が紹介されている。その後 Sloviter¹⁰⁾、Geyer³⁾、大柳⁹⁾らの基礎的研究によって fluorocarbon 化合物および乳化剤の選択と、その効果および毒性の検討が詳細におこなわれた。

今回我々は Fluosol-DA 20% および 35% (FDA-20, FDA-35 と略す、(株)ミドリ十字より供与、Table 1) の高度脱血犬の脳に対する急性期ならびに慢性期の作用を検討したので報告する。

2. 実験方法

体重 10~15Kg の beagle 成犬25頭を用い、sodium pentobarbital (25mg/kg, i.v.) 麻酔下に純酸素による調節呼吸 (Aika R-60 respirator 使用) をおこない PaO_2 を 400~600mmHg, $PaCO_2$ を 30~40mmHg に保った。大腿動脈、下大静脈、伏在静脈に cannulation して各種測定ならびに脱血・輸液路に供した。全身血

圧は大腿動脈に連結した圧トランスデューサー (MPU-0.5 日本光電社) により測定した。脳波は両側前頭部硬膜外より誘導した。心電図、全身血圧および脳波は記録計 (多目的ポリグラフ、日本光電社) に記録した。2~3カ月以上生存した例については CT scan (EMI 1010) による検査ならびに剖検脳の肉眼的、光顕的 (H. E., Nissle, myelin 染色) 検索をおこなった。

脱血交換には大腿動脈および伏在静脈を用いた。交換輸液には、① Fluosol-DA 35% (FDA-35) 群 ② Fluosol-DA 20% (FDA-20) 群 ③ Lactated Ringer 液 (対照群) をおのおの 1500~2000ml (150ml/kg) 使用し、1ml/kg/min の速度で脱血量と等量交換した。全身状態が許す限り以上の条件でヘマトクリット値を 1~6% に低下させ、この状態を 1~5時間保ったのち、保存しておいたヘパリン化自家血を 40ml/kg の割合で返血した。RISA 使用による循環血液量の測定、ならびに中心静脈圧を指標にして、各群とも Lactated Ringer 液で輸液量の補正をおこなった。

麻酔覚醒後12時間、酸素テント内で観察した後、room air にもどした。

3. 結 果

A. 生存率

短期 (術後1日以内) および長期 (術後2日以上) 生存率を Table 2 に示した。対照群では術後1日以内に4例中3例死亡したのに比較して、FDA-20群では全例、長期にわたって生存した。

B. 対照群における変化

Lactated Ringer 液による脱血交換をおこなうと血圧の低下傾向および著明な脳波の徐波化が認められた (Fig. 1)。徐波は4例全例に出現した。徐波が出現したままの状態で1.5時間放置した後自家血の返血をお

Table 1 Composition of Fluosol-DA 20% and 35% as erythrocyte substitutes.

	《Fluosol-DA 20%》	《Fluosol-DA 35%》
FDC (perfluorodecalin)	17.5w/v%	30.6w/v%
FTPA (perfluorotripropylamine)	7.5w/v%	13.1w/v%
Pluronic F 68	3.4w/v%	3.4w/v%
Yolk phospholipids	0.5w/v%	0.5w/v%
Glycerol	1.0w/v%	1.0w/v%
(contained in Medidex bag ; to be stored in frozen state at -5~-30°C)		

For Fluosol-DA		
	20%	35%
	〔Annex solution-C〕	〔Annex solution-D〕
KCl	0.567w/v%	0.517w/v%
NaHCO ₃	3.50 w/v%	3.19 w/v%

	〔Annex solution-H〕	〔Annex solution-I〕
NaCl	4.28 w/v%	3.90 w/v%
CaCl ₂	0.200w/v%	0.182w/v%
MgCl ₂	0.144w/v%	0.131w/v%
Glucose	1.28 w/v%	1.17 w/v%
Hydroxyethylstarch	21.44w/v%	21.44w/v%

in pyrogen-free distilled water, autoclave-sterilized.

Indicated ratio of mixture

《Fluosol-DA》 emulsion	400ml
Annex solution-C or-D	30ml
Annex solution-H or-I	70ml
to make	500ml

Table 2 Comparison of the survival rate of each group. Short term means within one day, and long term more than 2 days after exchange transfusion.

	No.	Short term survival	Long term survival
FDA-35	15	60%	40%
FDA-20	6	100%	100%
LR sol.	4	25%	25%

こなうと脳波の改善が見られたが、 3カ月後のCT scan および剖検では中程度の脳室拡大が認められた (Fig. 2).

C. FDA-35 群における変化

FDA-35を用いて脱血交換をおこなうと対照群と比

較して心循環系は相対的に安定していた。しかしヘマトクリット値の低下とともに脳波上、徐波 (Fig. 3) あるいは低振幅 (Fig. 4) が15例中8例に認められた。またこの群では長期生存例6例中3例にCT scan 上、脳室拡大が出現した (Fig. 5).

D. FDA-20 群における変化

FDA-20を用いて脱血交換をおこなうと、ヘマトクリット値3〜5%の状態でも血圧の低下や脳波の変化は認められなかった。しかしながら低ヘマトクリット状態で放置しておくと、6例中1例のみに2.5時間後、一過性に徐波の出現をみた (Fig. 6)。本群の長期生存6例では、CT scan 上、およびその後の剖検においても脳室拡大は認められなかった (Fig. 7).

E. 組織学的検索

FDA-35群およびFDA-20群全例に hypoxic change

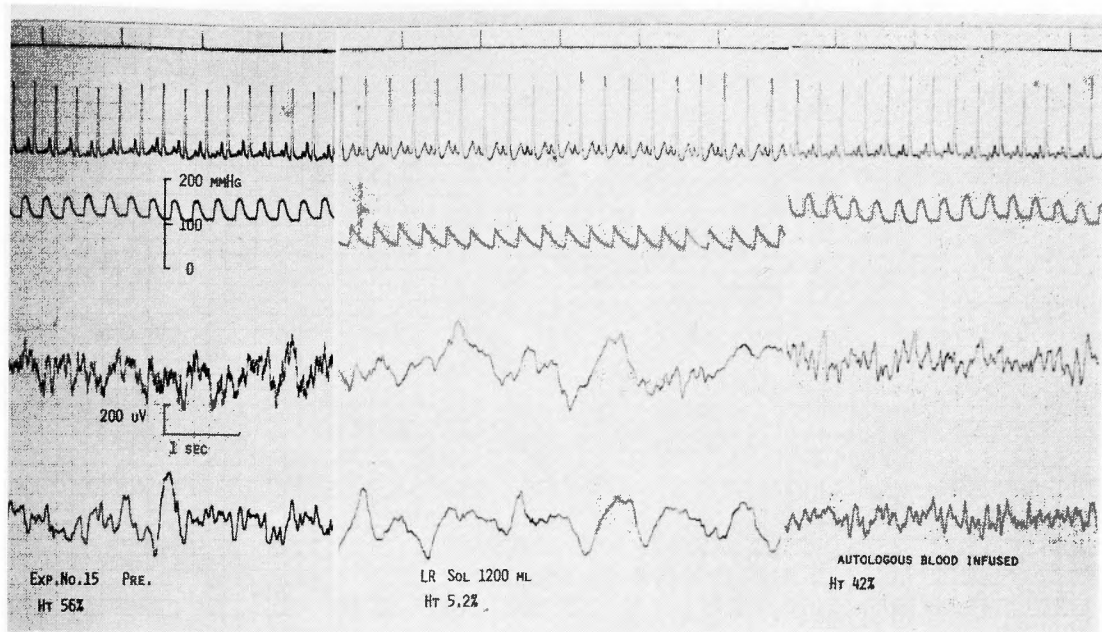


Fig. 1 Exchange transfusion with Lactated Ringer's solution. Slow waves were observed at the hematocrit value of 5.2% which disappeared after blood infusion.

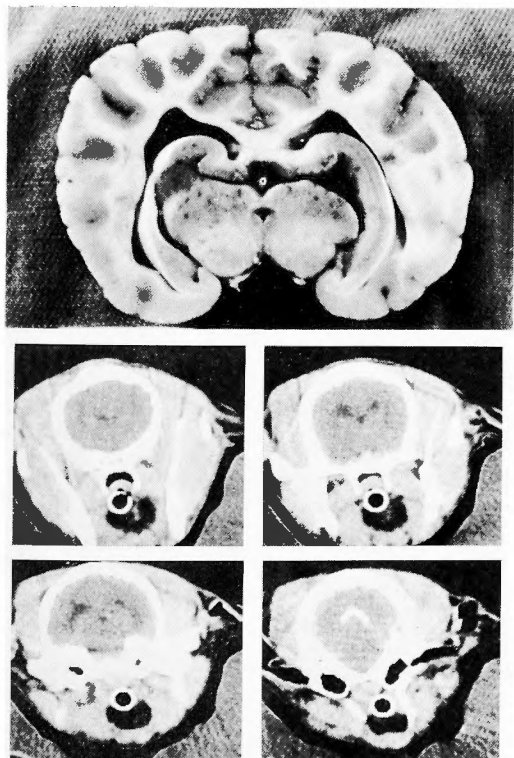


Fig. 2 CT scan and autopsy in the same case in Figure 1. The ventricles yielded mild dilatation.

をきたしやすい大脳皮質細胞、大脳基底核細胞、海馬細胞、ならびに小脳のプルキンエ細胞や顆粒細胞を中心に光顕的に検索した。脳室拡大をきたした例も含めて、光顕レベルで認められる異常はなかった (Fig. 8)。

4. 考 案

本研究で明らかになったように、Fluosol-DA 20% (FDA-20) では、短期および長期生存率は100%であり (Table 2)、脳波異常出現率は17%と他群と比較して著しく小さくかつ一過性であり (Table 3)、脳室拡大の出現率は0%であった (Table 4)。従って本研究で設定した高度脱血交換条件下 (ヘマトクリット値1~6%) では、Fluosol-DA、特に FDA-20 は対照群の Lactated Ringer 輸液よりもはるかに中枢神経系に

Table 3 Comparison of the incidence of electroencephalographic changes in severely hemodiluted condition of each group. (→): no change. (+): marked change. (?): equivocal change.

	No.	(→)	(+)	(?)
FDA-35	15	27%	53%	20%
FDA-20	6	83%	17%	
LR sol.	4		100%	

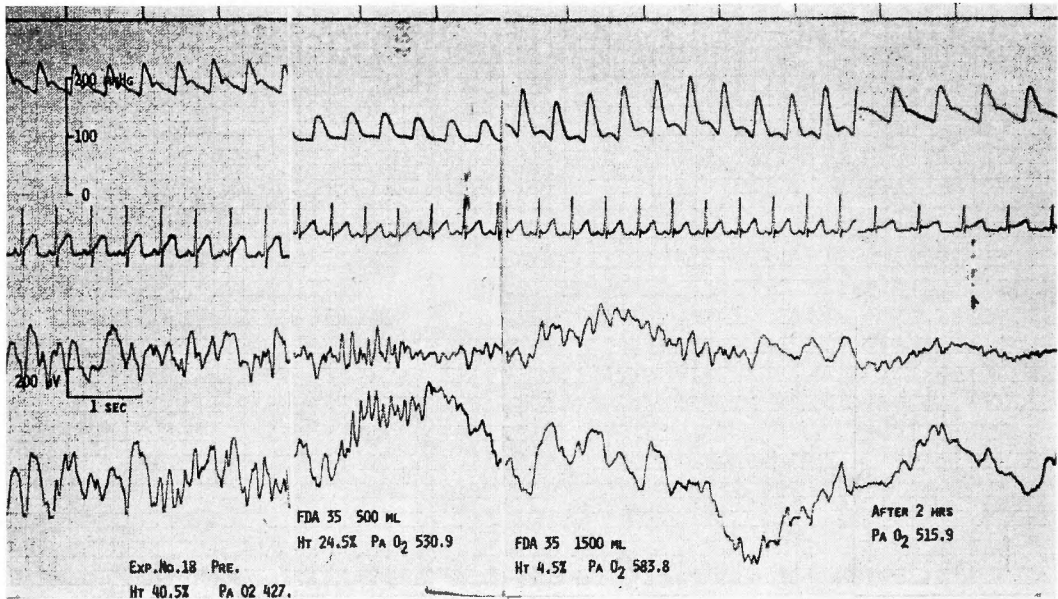


Fig. 3 Exchange transfusion with Fluosol-DA 35% (FDA-35). Slow waves were observed.

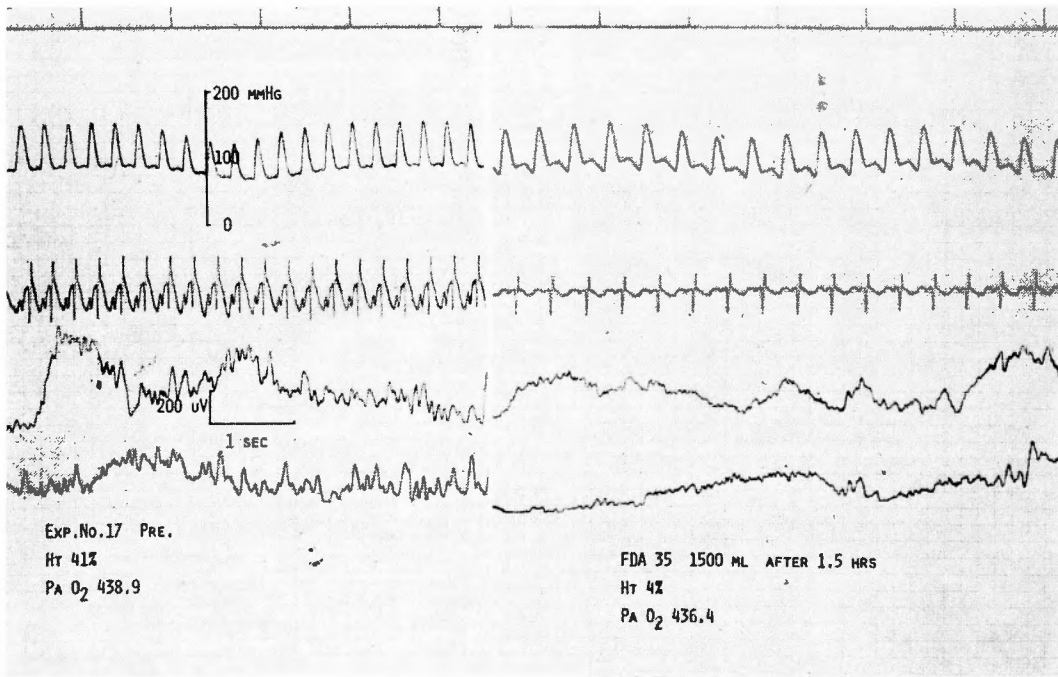


Fig. 4 Exchange transfusion with Fluosol-DA 35% (FDA-35). Low amplitude of the waves was noted.

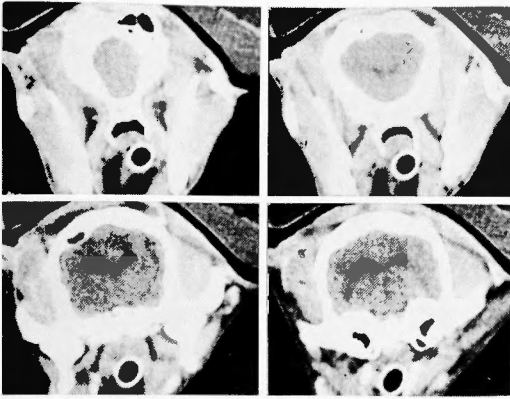


Fig. 5 CT scan in the same case in Figure 4 showed severe ventricular dilatation.

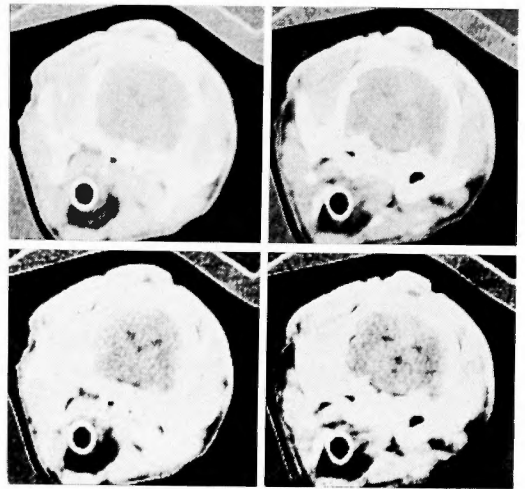


Fig. 7 CT scan in the same case in Figure 6 revealed no abnormalities.

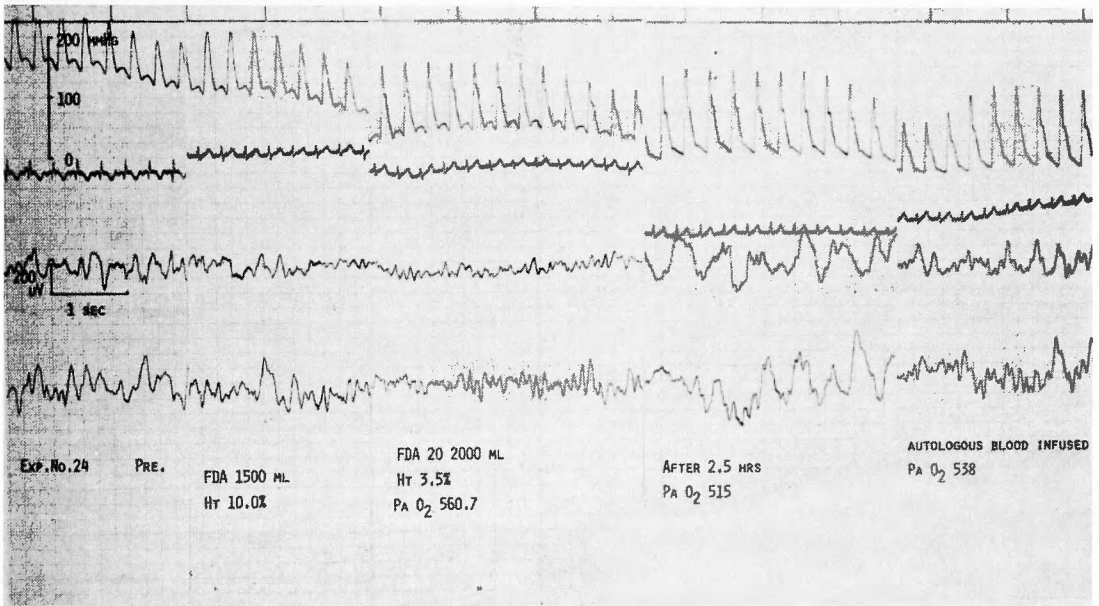


Fig. 6 Exchange transfusion with Fluosol-DA 20% (FDA-20). There was no electroencephalographic change observed at the moment the lowest hematocrit value of 3.5% was reached. However, slow waves appeared transiently 2.5 hours after that.

Table 4 Comparison of the incidence of ventricular dilatation in each group.

	No.	(-)	(+)
FDA-35	6	50%	50%
FDA-20	6	100%	
LR sol.	1		100%

対して有効であり、臨床応用に適していると考えられる。しかしながら、これらの使用に際してはその酸素解離曲線¹¹⁾よりみて、高酸素状態に保つことが必要である。

脳波の徐波化、低振幅などの変化は脳組織のhypoxiaの反映と考えられ、FDA-20 では対照群と比較して脳

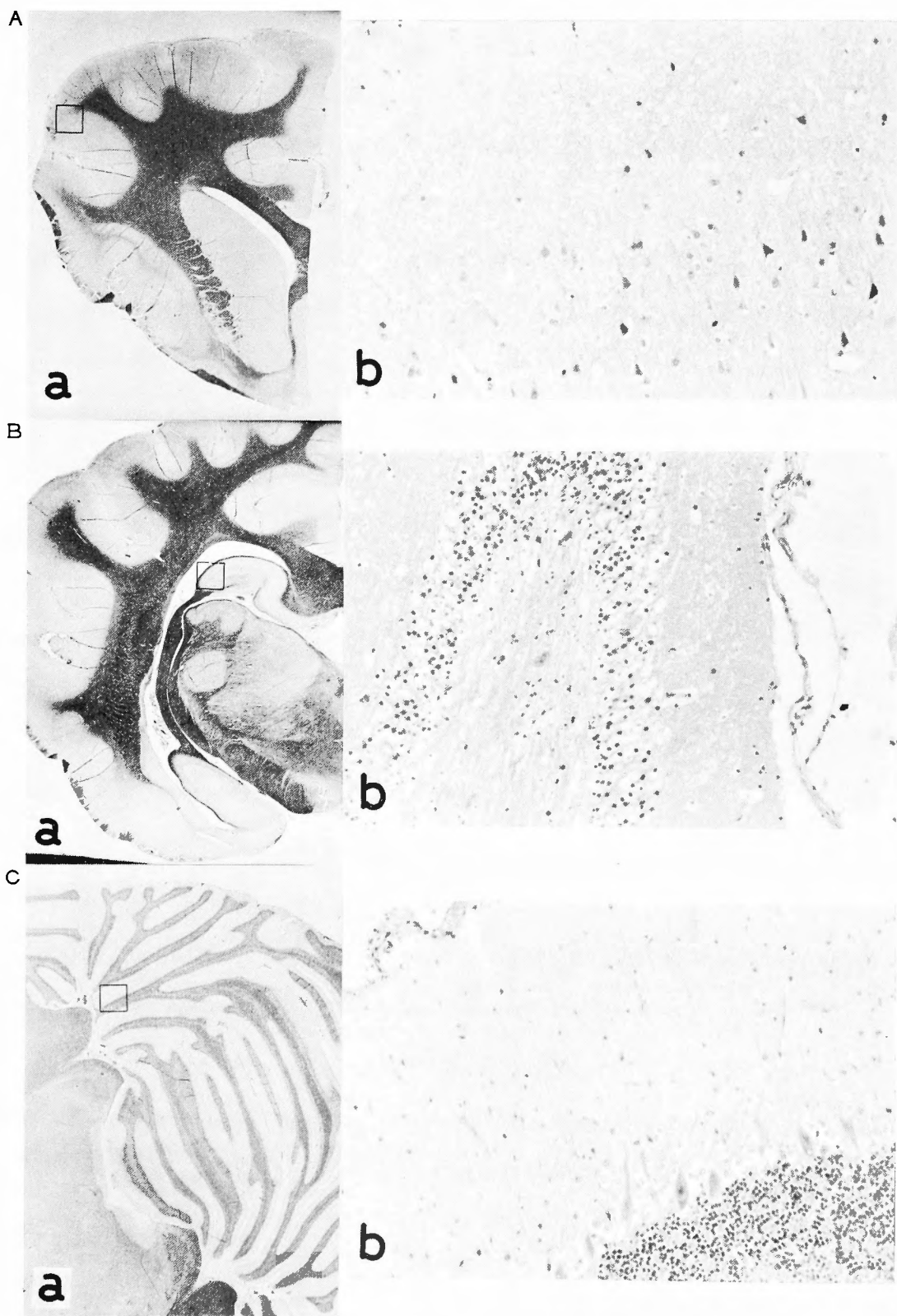


Fig. 8 Microscopic examination of cerebral cortex (A), hippocampus (B) and cerebellum (C) in myelin stain $\times 2$ (a) and H. E. stain $\times 200$ (b). No hypoxic changes were observed.

波異常の出現率が著しく小さかったのは FDA-20 がもつ酸素運搬能によるものと考えられる¹¹⁾。一方 FDA-20 よりもより高い酸素運搬能を持つ FDA-35 の脳波異常の出現率は、対照群よりも小さいものの、FDA-20 に比較すると大きな値となった (Table 3)。これは FDA-35 の組成内容によるものではなく、粘性度の差異 (FDA-35 : 3.9 cp at 37°C, FDA-20 : 2.4 cp at 37°C) によるものと考えられる⁸⁾。従って FDA-35 などの高濃度 Fluosol-DA は本研究で用いたような著しい低ヘマトクリット状態の補正の目的には不適当と考えられ、むしろ中程度の低ヘマトクリット状態の補正⁵⁾、あるいは高い酸素運搬能が急速に必要とされる状況や体外灌流³⁾⁶⁾にその有効性が著明であると推定される。

対照群および FDA-35 群の 1 部に認められた脳室拡大 (Table 4) は、脳脊髄液の流通障害などを生ぜしめる原因や剖検時所見はなく、脳萎縮によるものと理解される。しかし光顕レベルでの組織学的変化は認められなかった。

Fluorocarbon の低酸素状態の脳組織に対する効果に関する研究は比較的少い。大柳⁹⁾、Sloviter¹⁰⁾、山田¹²⁾は fluorocarbon 乳剤で脳を灌流し、正常な代謝がみられること、脳波の持続時間が対照群より長いこと、非灌流領域が狭いことを示し、fluorocarbon のもつ中枢神経系低酸素状態に対する効果を明らかにした。beagle 犬を用いた本研究の結果は、おおむね、以上の脳灌流実験の結果と一致した。

次報では臨床的にみられる中程度の低ヘマトクリット状態 (15~20%) における Fluosol-DA 製剤の作用を霊長類を用いて検討する予定である。

5. 結 論

人工血液として開発された Fluosol-DA 20% および 35% を用いて、高度脱血犬の脳組織に対する効果を検討した。

1) Fluosol-DA 20% では生存率 100%、脳波異常出現率 17% であり、脳室拡大などの器質的变化は認められなかった。

2) Fluosol-DA 35% では、効果は対照群の Lactated Ringer 輸液にまさるものの、Fluosol-DA 20% にはおよばなかった。

3) 従って著しい低ヘマトクリット状態における中枢神経系の変化に対しては、Fluosol-DA 20% の投与は有効であると考えられる。

文 献

- 1) Burk D, Schade AL, et al : Reversible complexes of cobalt, histidine and oxygen gas. *J Biol Chem* **165** : 723-724, 1946.
- 2) Clark LC Jr, Gollan F : Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* **152** : 1755-1756, 1966.
- 3) Geyer RP, Monroe RG, et al : Organ perfusion and preservation. Survival of rats totally perfused with a fluorocarbon detergent preparation. Appleton Century Crofts, New York, pp. 85-96, 1968.
- 4) Naito R : Further studies on the use of Fluosol preparations developed since Stockholm-Symposium-1977. *Proc IV th Intern'l Sympos on Perfluorochemical Blood Substitutes* pp. 33-45, 1978.
- 5) Gollan F, Aono M., et al : Oxygen transport of colloidal fluorocarbon suspensions in asanguineous rabbits. *Am J Physiol* **229** : 1045-1049, 1975.
- 6) Hashimoto S, Watanabe T, et al : Fundamental study on myocardial energy metabolism of the perfused heart. *Proc Postcongr Sympos/X Intern'l Congress of Nutrition*, pp. 135-146, 1975.
- 7) 大村泰男 : 人工血液。医学シンポジウム第25輯 人工臓器, p. 1, 診断と治療社。1960.
- 8) Ohshita M, Sato M, et al : Effects of perfluorotributylamine (FC-43) on mitochondrial oxidative phosphorylation and adenine nucleotide metabolism of the perfused liver. *Proc Postcongr Sympos/X Intern'l Congress of Nutrition*, pp. 147-154, 1975.
- 9) 大柳治正, 藤田忠義, 他 : 人血赤血球としての Fluorocarbon particles. ガス運搬能とその機構について。外科 **33** : 1085-1090, 1971.
- 10) Sloviter HA and Kamimoto T : Erythrocyte substitute for perfusion of brain. *Nature*, **216** : 458, 1967.
- 11) Watanabe R, Inahara H, et al : Oxygen carrying capacity of perfluorochemical emulsions mixed with blood in vitro. *Proc Postcongr Sympos/X Intern'l Congress of Nutrition*, pp. 113-120, 1975.
- 12) Yamada H, Chyjo T, et al : Studies of isolated rat brain perfusion with emulsion of fluorocarbon. Report of a case of long electroencephalographic survival and effects of temporary interruption of cerebral blood flow on cerebral circulation. *Proc Postcongr Sympos/X Intern'l Congress of Nutrition*, pp. 121-134, 1975.