

一般演題

分子量, DS 値の異なる Hydroxyethyl starch (HES)  
の経時的微小血管内停滞率の比較

一杉岳<sup>1)</sup> 鈴木素野<sup>1)</sup> 正田絵美<sup>1)</sup> 久保田伊柄子<sup>1)</sup> 清水亨<sup>1) 2)</sup> 斉藤敏之<sup>1)</sup> 大井良之<sup>1)</sup>

1) 日本大学大学院歯学研究科麻酔学講座

2) Department of Bioengineering, University of California, San Diego, La Jolla, California

緒言

現在, 各国で様々な種類の HES 輸液製剤が市販されており, 手術や外傷における出血時の循環動態改善目的に頻りに用いられている<sup>1, 2)</sup>。欧州では平均分子量が 70~450 kDa, DS 値が 0.4~0.7 の HES 製剤, アメリカでは平均分子量 450 kDa, DS 値が 0.7 の Hetasarch®, カナダでは平均分子量 270 kDa, DS 値が 0.7 の Pentastarch®, 日本においては平均分子量 70 kDa, DS 値が 0.5 の Hespander®などが主に臨床的に使用されている<sup>3)</sup>。これらの HES 製剤はそれぞれ分子量や DS 等が異なり<sup>4)</sup>、膠質浸透圧に影響する高分子の血管内停滞率や浮腫の原因となる血管外漏出に影響を与えると考えられる。

本研究では将来的に最も有効な HES 輸液製剤を開発する目的で、通常の外科的手術等を想定した出血(循環血液量の 10%脱血)性ショックモデルを対象に、各種 HES が微小血管でどのように振る舞うかを生体顕微鏡下で経時的に観察することとした。

その後 6%FITC-HES 輸液製剤を輸液し直接微小循環を観察可能な Cremaster 筋において蛍光生体顕微鏡を用いて<sup>5) 6) 7)</sup>、蛍光輝度の変化から微小血管内における HES の停滞率、血管外への漏洩率を経時的に比較した<sup>5) 8) 9) 10)</sup>。

1. 材料および方法

本研究は日本大学歯学部実験動物委員会の承諾を得て National Institutes of Health ガイドラインに沿って行われた。

対象

体重約 300g の SD 系雄性ラット(日本クレア株式会社)を用いた。ラットの飼育は、午前 7 時点灯の 12 時間明暗サイクル、室温 23 ± 2°C、湿度 55 ± 5% に設定した恒温恒湿の飼育室で行い、飼料(オリエンタル酵母工業)と水を自由に摂取させた。

方法

新たに製作した 3 種類の HES (味の素株式会社)に Thomas らの方法<sup>11)</sup>を用いて FITC を付加した。HES は HES-A (平均分子量: 150 ~ 200 kDa, DS 値: 0.6~0.68, C2 位/C6 位比= 8:1)、HES-B (平均分子量: 175~225 kDa, DS 値: 0.45~0.55, C2 位/C6 位比=6:1)、HES-C (平均分子量: 550~850 kDa, DS 値: 0.7~0.8, C2 位/C6 位比=5:1) の 3 群に分類した。

ラットに 50mg/kg の sodium pentobarbital (ネンブタール®; 大日本製薬)を腹腔内に投与して麻酔した。保温パッド上に仰臥位で固定後気管切開し、ポリエチレンカテーテル(内径 2.1mm)を挿管し、自発呼吸下で管理した。実験を通して体温は 37~38°C に管理した。輸液ラインとして尾静脈に 24 ゲージ静脈留置針を留置し、同血管から Lumb ら<sup>12)</sup>の手法により、生理食塩水を 2.5~5ml/kg/h の速度で維持輸液とした。右総頸動脈にカテーテルを挿入し電気血圧計(BP-308ETI; NIPPON COLIN 社)にて動脈圧を持続的に測定した。左鼠径部に動物用パルスオキシメーター(モデル 8600V; NONIN 社)を装着し、room air 下で SpO<sub>2</sub> が脱血開始までの間 95% 以上を保つ事を確認した。

次に生体顕微鏡下での微小循環観察用に、Brown ら<sup>7)</sup>の手法により Cremaster 筋を準備し、観察定点となる4点(主幹血管 A1, V1 から2回目の分岐となる A2, V2 の各血管内の2点と A2, V2 血管壁から 100 μm 外側部の2点)を蛍光生体顕微鏡 (BX51WI; OLYMPUS 社) 下で固定した<sup>8)</sup>。右鼠径動脈カテーテルから10分かけて脱血(10%/全循環血液量)を行い、脱血終了から30分間放置後、尾静脈から脱血量と同量の各種 FITC-HES 輸液を輸液ポンプ (SP-500D; JMS 社) を用いて約3分(速度 0.1ml/min/100g)で投与し、投与終了後から120分間継続して観察した。FITC-HES の動向は CCD カメラ (DP70; OLYMPUS 社) によって自動的に5分おきに撮影され、計24回撮影用モニター (High-resolution monitor; OLYMPUS 社) によって取り込まれた。それらのデータは Hard Disk に保存され、後に蛍光輝度の濃淡の変化を画像分析ソフト (MetaMorph®; Molecular devices 社, USA) によって評価した<sup>9)</sup>。なお相対的蛍光輝度変化度 ( $\Delta I$ ) は Bekker ら<sup>9)</sup>の方法に従って、 $\Delta I = 1 - (I_i - I_0) / I_0$  として表した ( $I_i$ ; 血管内蛍光輝度変化度、 $I_0$ ; 血管外蛍光輝度変化度)。また結果の一部は蛍光輝度変化率 ( $\Delta I \times 100$ ) として表記した。

### 統計学的方法

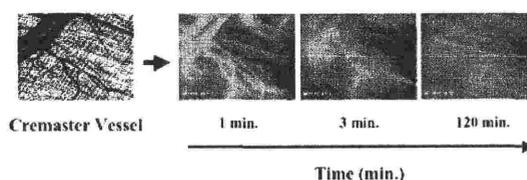
測定値は平均値と標準誤差 (mean  $\pm$  se) で表した。検定は群内比較と群間比較を行った。群内比較は各群について分散分析を行い、有意な場合には投与前値を対象として ANOVA の分散分析の多重比較検定を行った。群間比較は各群について分散分析を行い、有意な場合には群間毎に Scheffe *t* 検定法を行った。なお有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 2. 結果

各群は HES-A は  $n=20$ 、HES-B は  $n=20$ 、HES-C は  $n=21$  であった。実験を通して3群間の平均動脈圧に有意差は認められなかった。

脱血後の Cremaster 筋微小血管において、HES 輸液開始直後から間質腔へ漏出する輝度の変化が観察された (Fig. 1)。各静脈 V2,

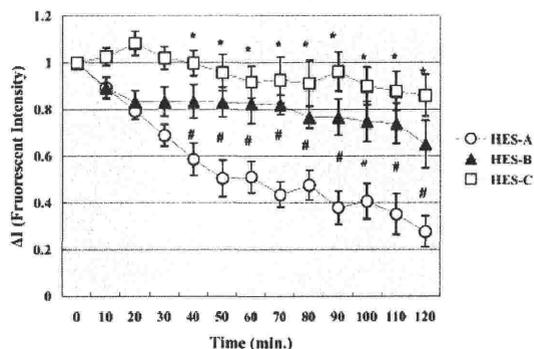
Fig.1. The color image of leaking hydroxyethyl starch particles bound with fluorescein-isothiocyanate (FITC-HES) under the intravital microscope over time.



The particular amount of FITC-HES was shown to have leaked out in a few seconds from the capillary blood vessels in the cremaster muscle.

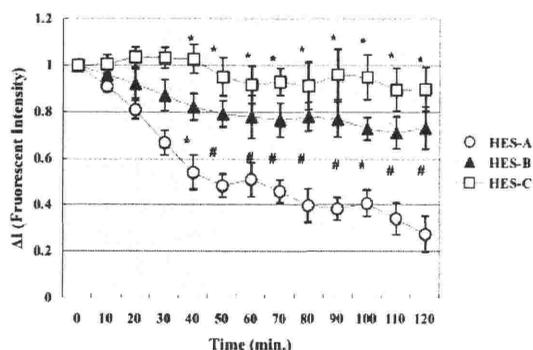
動脈 A2 での停滞率は3群間においてそれぞれ異なった (Fig. 2, 3)。Fig. 2 は V2 での FITC-HES の120分間における血管内停滞率を表している。HES-A の停滞率の減少は著しく、-B、-C の減少は-A よりも緩やかであった。120分後の HES-A、-B、-C の停滞率は開始時を基準にして%表示し、それぞれ  $27 \pm 6.6\%$ 、 $73 \pm 10.2\%$  そして  $89 \pm 8.7\%$  であった。HES-B ( $P=0.028$ ) と HES-C ( $P=0.038$ ) の停滞率減少は、HES-A に対して輸液開始後40分から統計学的に有意差を示した。

Fig.2. Retention of three groups of hydroxyethyl starch (HES) inside V2 blood vessel.



\*  $P < 0.05$  significantly difference between HES-A and HES-C.  $\Delta I$  axis, means the value of fluorescent intensity at each time point compared to that at time zero. #  $P < 0.05$  significantly difference between HES-A and HES-B.

Fig.3. Retention of three groups of HES inside A2 blood vessel.

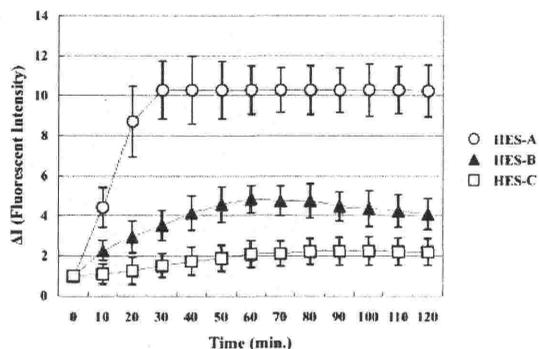


\* P < 0.05 significantly difference between HES-A and HES-C. ΔI, axis, means the value of fluorescent intensity at each time point compared to that at time zero. # P < 0.05 significantly difference between HES-A and HES-B.

Fig. 3 では A2 における FITC-HES の 120 分間における血管内停滞率を表している。動脈の A2 も静脈の V2 と同じように全ての群において FITC-HES 停滞率はそれぞれ減少した。HES-A は動脈でも静脈と同じように最も停滞率の減少は大きかった。120 分後の HES-A、-B、-C の停滞率は開始時の基準に対する % 表示でそれぞれ  $27 \pm 6.6\%$ ,  $73 \pm 10.2\%$  そして  $89 \pm 8.7\%$  であった。HES-B (P=0.022) と HES-C (P=0.037) は HES-A に比して、優位に停滞率は減少した。

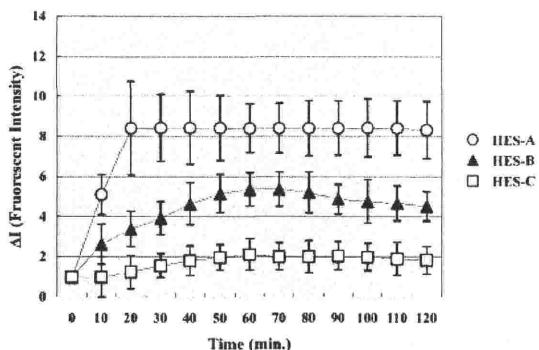
また V2 の血管外での FITC-HES の経時的漏洩率の測定も行った (Fig. 4)。血管外での HES-A の輝度の増加は著しく大きいものに対して、HES-C は最も少なく HES-B は A と B の間であった。しかし 3 群に統計学的有意差は認められなかった。同様に Fig. 5 は A2 の血管外での FITC-HES の経時的漏洩率の測定結果である。静脈と同じく HES-A の輝度の増加は最も大きいものに対して、HES-C は最も少なく HES-B は常に A と C との間であった。3 群に統計学的有意差は認められなかった。

Fig.4. Fluorescent Intensity of HES outside V2.



Fluorescent Intensity of HES-A increased the most rapidly. The increased of HES-C was a smallest. The increased of HES-B was in between HES-A, HES-C in the figure. However, no significant difference was found anywhere in the figure between groups.

Fig.5. Fluorescent Intensity of HES outside A2.



Fluorescent Intensity of HES-A increased the most rapidly. The increased of HES-C was a smallest. The increased of HES-B was in between HES-A, HES-C in the figure. However, no significant difference was found anywhere in the figure between groups.

### 3. 考察

今回我々は組成の異なる新たな 3 種類の FITC-HES を作製し、微小循環領域での経時的な HES の動向の観察に蛍光生体顕微鏡を初めて用いた<sup>11)13)14)</sup>。これら新たな 3 種類の FITC-HES は最近の HES 輸液製剤の平均分子量による分類からすると、2 種類が中分子 HES、

残り1種が高分子HESに属する。日本で市販されているHES製剤は低分子のみであるが、今回の研究ではこれに相当する分子量のHESは含まれなかった。

高分子のHES-Cの血管内停滞率が長いことはある程度予想できたが、同じ中分子に属するHES-AとHES-Bの血管内停滞率が異なるとは大変興味深い。これら中分子HES群の平均分子量はほぼ同じ175~200 kDaであるが、DS値がHES-A、-Bで0.64と0.5、C2位/C6位比が8:1と6:1である。HESの分子構造からみると、HES-Aの方は-Bに比してやや分子量は小さいものの分解されにくい性質を持っている。しかし本研究の結果からは、HES-Aが血管内停滞率は低値を示した。

血管内停滞率に影響を与える要因として、血管因子として透過性、HES側の因子として分子量<sup>1)4)15)</sup>、分子量分布<sup>16)</sup>、DS<sup>17)</sup>、C2/C6比<sup>18)</sup>などが考えられる。本研究では、出血量が循環血液量の10%であり、血管透過性に与える影響は少ないと考えられ、血管側には問題はなかったと思われる。HES分子に関しては、使用中分子HESは両者ともアルブミン分子よりも大きく、平均分子量の点からは差はないと考えられるが、各群の分子量のばらつきに差があった可能性はある。特にA群では輸液当初から血管外漏出が観察されたことから小分子を多く含んでいた可能性はある。しかし、B群よりも分解されにくい構造を有するA群で血管内停滞率の減少が著しかった。可能性として、分解に関する要因として、HESのブドウ糖がグルコシド結合する部位であるC1とC4の結合率が考えられる。HESの $\alpha$ -1, 4グルコシド結合は $\alpha$ -アミラーゼによって切断されるが、この部位の割合が異なればHESの分解にも影響が出ると予想される。このグルコシド結合に関しては、本研究で用いたHESの情報として得られていない。

今回我々は同じ中分子HESにも関わらず、おそらく組成の違いによるものと思われる血管内停滞率が経時的に異なる現象を生体顕微鏡下でとらえた。長時間の循環血液量維持のためには高分子HESがより適しているが、その反面止血機能障害やアレルギーなどの副作用

発生率も高くなる。そういった背景からも、特に欧州では中分子、低DS値のHES製剤の開発が進んでおり、従来から使用されている中分子、高DS値のHESと臨床で比較し<sup>19)20)21)22)23)</sup>、副作用が少なく同じような循環維持効果を有する報告が出ている。

今後の課題として、血管外漏出のみならず腎排泄の問題<sup>1)4)</sup>、血管内皮細胞障害による問題<sup>7)</sup>などに注目する必要がある。

#### 4. 結語

今回我々は、組成の異なる3種のFITC-HESの微小血管内停滞率を蛍光生体顕微鏡を用いて経時的に測定した。出血(循環血液量の10%)性モデルラットにおいて、中分子HES(平均分子量:175~225 kDa, DS値:0.45~0.55, C2位/C6位比=6:1)はもう一つの中分子HES(平均分子量:150~200 kDa, DS値:0.6~0.68, C2位/C6位比=8:1)よりも長時間にわたり効果を発揮し、高分子HESに匹敵するほどの血管内停滞率を有することを示した。今回用いた中分子、低DS値のHESは非常に有用性が高い可能性があると考えられる。また臨床使用の際、HES輸液製剤の平均分子量のみならず濃度、DS値、C2/C6比、グリコシド結合部位にも注目する必要があると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Boldt J, Suttner S: Plasma substitutes. *Minerva Anesthesiol* 2005;71:741-58.
- 2) Jones SB, Whitten CW, Despotis GJ et al: The influence of crystalloid and colloid replacement solutions in acute normovolemic hemodilution: a preliminary survey of hemostatic markers. *Anesth Analg* 2003;96:363-8.
- 3) Mizushima Y MA: *The Current Drugs in Japan*. Nankodo Publishing Co 2003:386.
- 4) Boldt J: Fluid choice for resuscitation of the trauma patient: a review of the physiological, pharmacological, and clinical evidence. *Can J Anaesth* 2004;51:500-13.

- 5) Brookes ZL, Brown NJ, Reilly CS: Response of the rat cremaster microcirculation to hemorrhage in vivo: differential effects of intravenous anesthetic agents. *Shock* 2002;18:542-8.
- 6) Hutchins PM, Goldstone J, Wells R: Effects of hemorrhagic shock on the microvasculature of skeletal muscle. *Microvasc Res* 1973;5:131-40.
- 7) Brown NJ, Pollock KJ, Bayjoo P et al: The effect of cryotherapy on the cremaster muscle microcirculation in vivo. *Br J Cancer* 1994;69:706-10.
- 8) Miller FN, Joshua IG, Anderson GL: Quantitation of vasodilator-induced macromolecular leakage by in vivo fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 1982;24:56-67.
- 9) Bekker AY, Ritter AB, Duran WN: Analysis of microvascular permeability to macromolecules by video-image digital processing. *Microvasc Res* 1989;38:200-16.
- 10) Menger MD, Pelikan S, Steiner D et al: Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992;263:H1901-6.
- 11) Thomas E, Jones G, de Souza P, Wardrop C, Wusteman F. Measuring blood volume with fluorescent-labeled hydroxyethyl starch. *Crit Care Med* 2000;28:627-31.
- 12) Lumb WV, Wynn JE: *Veterinary anaesthesia* 1973;Philadelphia:Lea & Febiger.
- 13) Massey EJ, de Souza P, Findlay G et al: Clinically practical blood volume assessment with fluorescein-labeled HES. *Transfusion* 2004;44:151-7.
- 14) Schaeffer RC, Jr., Renkiewicz RR, Chilton SM et al: Preparation and high-performance size-exclusion chromatographic (HPSEC) analysis of fluorescein isothiocyanate-hydroxyethyl starch: macromolecular probes of the blood-lymph barrier. *Microvasc Res* 1986;32:230-43.
- 15) Yacobi A, Stoll RG, Sum CY, Lai CM et al: Pharmacokinetics of hydroxyethyl starch in normal subjects. *J Clin Pharmacol* 1982;22:206-12.
- 16) Persson J, Grande PO: Volume expansion of albumin, gelatin, hydroxyethyl starch, saline and erythrocytes after haemorrhage in the rat. *Intensive Care Med* 2005;31:296-301.
- 17) James MF, Latoo MY, Mythen MG et al: Plasma volume changes associated with two hydroxyethyl starch colloids following acute hypovolaemia in volunteers. *Anaesthesia* 2004;59:738-42.
- 18) Treib J, Haass A, Pindur G et al: HES 200/0.5 is not HES 200/0.5. Influence of the C2/C6 hydroxyethylation ratio of hydroxyethyl starch (HES) on hemorheology, coagulation and elimination kinetics. *Thromb Haemost* 1995;74:1452-6.
- 19) Madjdpour C, Dettori N, Frascarolo P et al: Molecular weight of hydroxyethyl starch: is there an effect on blood coagulation and pharmacokinetics? *Br J Anaesth* 2005;94:569-76.
- 20) Van der Linden PJ, De Hert SG, Deraedt D et al: Hydroxyethyl starch 130/0.4 versus modified fluid gelatin for volume expansion in cardiac surgery patients: the effects on perioperative bleeding and transfusion needs. *Anesth Analg* 2005;101:629-34.
- 21) Langeron O, Doelberg M, Ang ET, Bonnet F et al: Voluven, a lower substituted novel hydroxyethyl starch (HES 130/0.4), causes fewer effects on coagulation in major orthopedic surgery than HES 200/0.5. *Anesth Analg* 2001;92:855-62.
- 22) Gallandat Huet RC, Siemons AW, Baus D et al: A novel hydroxyethyl starch (Voluven) for effective perioperative plasma volume substitution in cardiac surgery. *Can J Anaesth* 2000;47:1207-15.
- 23) von Roten I, Madjdpour C, Frascarolo P et al: Molar substitution and C2/C6 ratio of hydroxyethyl starch: influence on blood coagulation. *Br J Anaesth* 2006;96:455-63.