

【 原 著 】

急性一酸化炭素中毒における光照射を用いた新しい治療についての検討

鹿志村剛，細山明子，古屋利行，小松弘嗣，平 泰彦

聖マリアンナ医科大学救急医学教室

我々は、光照射がヘモグロビン (Hb) に結合した一酸化炭素 (CO) を解離させる性質に着目し、激増しているCO中毒に対し光照射が新たな治療法となり得るかを検討した。

Sprague Dawley (SD) 系雄性ラットに前処置として循環血液量の90%脱血及びそれと同量のサリンヘス (6%ヒドロキエチルデンプン) 輸液による同時交換を行い、その後COを結合させた人工酸素運搬体 (ヘモグロビン小胞体, hemoglobin vesicle, HbV) を投与し、擬似的にラットCO中毒モデルを作成した。このラットの胸部に光を照射した群 (n=5) と非照射群 (n=5) とで血中CO-Hb比率の経時的变化をCO結合HbV投与直後・30分・60分・90分で比較した。

観察期間中、光照射群の方が血中CO-Hb比率の低下が速く、CO結合HbV投与終了直後のCO化率を100%とすると、90分後におけるCO化率は光照射群の方が光非照射群に比べ有意に低下した ($p < 0.05$)。

急性一酸化炭素中毒に対して光照射の有用性が示唆された。

キーワード 人工酸素運搬体, 血中一酸化炭素濃度, 高気圧酸素治療

【Original】

New application of light irradiation to the treatment of acute CO poisoning

Takeshi Kashimura, Akiko Hosoyama, Toshiyuki Furuya, Hirotsugu Komatsu, Yasuhiko Taira

St. Marianna University School of Medicine Department of Emergency and Critical Care Medicine

The ability of light irradiation to dissociate carbon monoxide (CO) from hemoglobin (Hb) was examined for the treatment of CO poisoning. We established a CO poisoning simulation model with rats. Ninety percent of circulating blood in male Sprague Dawley rats was replaced by 6% hydroxyethyl starch. CO-bound artificial oxygen carriers (hemoglobin vesicle, HbV) were then injected into the rats. Blood CO-Hb ratios immediately, 30, 60, and 90 min after the injection of CO-bound HbV were compared between the light-irradiated group (n=5) and unirradiated group (n=5). Blood CO-Hb ratio 90 min after the injection was significantly smaller in the light-irradiated group than in the unirradiated group, suggesting a possible new application of light irradiation to the treatment of acute CO poisoning which has been occurring more frequently in recent years.

keywords oxygen carrier, CO poisoning, HBO

緒言

本邦において一酸化炭素 (carbon monoxide, 以下COと記す)中毒死亡者数は、2002年以前では年間1000

～2000人であったのに対し2003年以降は3000人以上と激増している。これはわが国の中毒性疾患の死亡者数の約半数を占め、大きな社会的問題となっている¹⁾。

現在CO中毒に対しては高圧酸素療法 (hyperbaric oxygenation, 以下HBO) や高濃度酸素吸入が主たる治療法であるが, その具体的治療方法や中枢神経系障害に対する治療効果については統一した見解がない。また, HBO施設を有する医療機関は, 日本高気圧環境・潜水医学会の登録情報によると91施設しかない(2008年現在)。このような状況下, いかなる場所でも起こりえるCO中毒症例に対して, バイタルの維持を基本治療とし, CO中毒そのものに対する治療法としては高濃度酸素吸入しか持ち得ないのが現状である。このためどのような施設でも実施可能で, 特殊な医療機器を必要としない新たなCO中毒治療法が求められる。

今回われわれは, ヘモグロビン (Hb) と結合したCO (以下CO-Hbと記す) において光照射がCO-HbからのCOの解離を促進する性質に着目した。光照射がCO中毒の新たな治療戦略となり得るかを明らかにするため, ラットCO中毒モデルを作成し, 治療としての光照射群と非照射群との間でin vivoにおける血中CO-Hb比率に差があるかを検討した。

なお, 従来行われてきた, ラットを曝露用の容器に入れCOに曝露させることによって作成されたラットCO中毒モデルは曝露中の種々の物質の経時変化等を観察することには適していた。しかし, ラット血液はCOとHbの解離が非常に早いという性質を有しているため, 従来のラットCO中毒モデルは曝露後の経時的なCO-Hb比率の検討には適していなかった²⁾。そこで本研究ではCO曝露後のCO-Hb比率の経時変化を追うために, ヒト由来の精製Hbを用いて製造された人工酸素運搬体 (ヘモグロビン小胞体, hemoglobin vesicle, 以下HbV) を使用することによりヒトCO中毒に近い擬似的ラットCO中毒モデルを作成し, CO曝露後の経過を観察した。

方法

1, ラットCO中毒モデルの作製

雄性Sprague Dawley (SD) 系ラット (日本チャールス・リバー株式会社) を温度 23 ± 2 °C, 湿度 55 ± 5 %の飼育室で市販固型飼料および水を自由に与えて1週間の予備飼育後, 体重増加, 挙動ともに正常な7週齢 (体重255~282 g) の動物を計10匹用いた。

Table 1 Profile of hemoglobin vesicle (HbV)

項目	測定値
粒子径 (中心, nm)	262~269
Hb 濃度 (g/dL)	10.0~10.6
脂質濃度 (g/dL)	6.9~7.2
酸素飽和度 (P ₅₀ , Torr)	23~25
分散媒体	生理食塩水

ジエチルエーテル (和光純薬株式会社) 約2 mLにて麻酔導入し, その後イソフルレン (フォーレン/Abbott Japan) 1.0%の自発呼吸下吸入にて麻酔を維持した。

左大腿動脈及び尾静脈内にカニューレーションを行いラット推定全血量 (64 mL/kg) の90%を脱血し, これと同量のサリンヘス (6%ヒドロキシエチルデンプン/杏林製薬株式会社) を輸液し, 等量同時交換とした。

その後試験管内でHbV (早稲田大学理工学術院と慶応大学医学部が共同開発したヒト赤血球由来精製ヘモグロビンをリン脂質二分子膜小胞体に内包した製剤, Table 1 参照) に対し, 流量15 mL/minにて60分間のCOバブリングを行い, CO結合HbVを調製した。これを25 mL/kg相当量投与し, 擬似的ヒトCO中毒モデルを作成した。

2, 光照射および測定法

上記1の如くラットCO中毒モデルを作成した直後 (CO付加したHbVを投与終了直後) より前胸部左右2箇所にて光を照射した群 (n=5) と非照射群 (n=5) で投与直後・30分後・60分後・90分後における両群のCO-Hb比率を大腿動脈のカニューレより採取した動脈血を用い分光光度計 (紫外可視赤外分光光度計V-560/日本分光株式会社製) にて測定した。なお, CO-Hb比率の算出に際しては, 別途調製した100% CO結合HbVとCOを全く付加していないHbVの吸光度を測定し, 各々の吸収極大をもとに各観察点でのCO-Hb比率を計算した。光源には光源装置FLG-2 (協和光学工業株式会社製, 照度: 測定距離100mmにて27000 Lux・150 mmにて12000 Lux) を用い, 先端の集光レン

ズを取り外した状態で照射した。また前処置として、より強く血管内・心腔内・肺血管内へ光を照射するためラット前胸部の皮下組織を露出し、直接胸部に光源を接触させ連続照射を行った。なお本照射装置は光源に接続された約25cmの光ファイバーの先端から光を照射するため、照射部位が加熱されない構造となっている。またファイバーの先端部を前胸部に密着させ照射することにより、照度および照射面積を各ラットに対しほぼ一定に保つ事が出来た。

3. 統計処理

HbV投与直後(0分)のCO-Hb比率を100%とし、以降30分毎の各ポイントにおけるCO-Hb比率を百分率(%)で算出し、平均値±標準誤差(S.E.M.)で表した。各ポイントのデータに対しF検定を行い、等分散の場合はStudent's t-test (t検定)、不等分散の場合はAspin-Welchのt-test (Welch検定)を実施し、危険率5%未満の場合を有意差ありとした。統計解析用のソフトウェアとしては、4Stepエクセル統計Statcel 2 (株式会社星雲社)を使用した。

結果

CO-Hb比率の推移を Fig.1 に示す。

光照射群が非照射群に比して解離が速やかに進み、CO結合HbVを投与した直後のCO-Hb比率を100%としたときの相対的なCO化率は、曝露後30分で60.4±2.5%、60分で36.9±2.5%、90分で26.1±2.4%であった。一方、非照射群は30分で64.7±2.5%、60分で44.5±2.6%、90分で35.0±2.9%であった。曝露後90分における両群間の差はt検定にて有意であった($p < 0.05$)。両群ともに死亡例はなく、ラットの呼吸状態は安定し、呼吸数も70~115回/minの正常範囲内であり、その他全身状態にも特記すべき差は認めなかった。

考察

今回我々は光照射がCOとHbの結合を解離させる性質に着目し、光照射がCO中毒に対する新たな治療として臨床応用出来るか否かについて検討した。

1. CO中毒の疫学

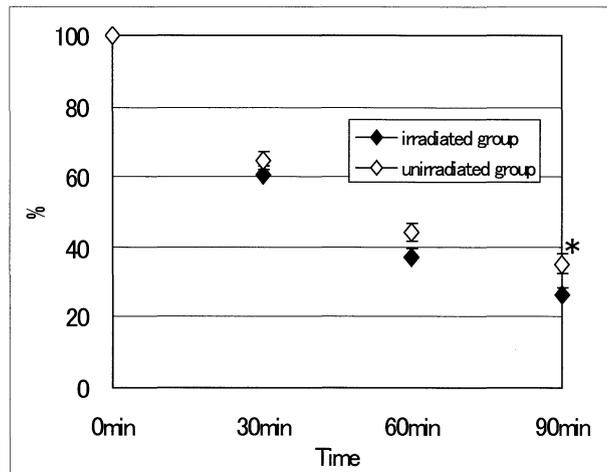


Fig.1 Time course of blood CO-Hb ratio after the injection of CO-bound HbV.

The CO-Hb ratio was determined immediately, 30, 60, and 90 min after the injection in the light-irradiated group (n=5) and the unirradiated group (n=5). Blood CO-Hb ratio decreased more rapidly in the irradiated group. The ratio of the irradiated group was significantly lower than that of the unirradiated group 90 min after the injection. * $P < 0.05$, Student's t-test.

COは炭素含有物質の不完全燃焼により発生する無色、無臭で刺激性のない毒ガスで、壁、天井、地面などに浸透しやすい。また空気と5%以上混合すると爆発する危険性が高い気体である。

本邦においては2003年を境として中毒患者が激増している。2002年以前は1000~2000人で経過していたが、2003年には3538人に激増し、その後も同様な傾向を示している。

主なCO中毒の原因は、家屋火災、ガス器具の不完全燃焼、自動車の排気ガス吸入、炭鉱内・トンネル内爆発事故等であるが、近年ではインターネットを媒体にした全く無関係な人々による集団練炭自殺も急増している³⁾。

2. CO中毒の臨床と病態

成書や解説論文によるとCO-Hb比率が10%以下では殆ど自覚症状がなく、10~20%では前頭部頭重感や皮膚血管の拡張が出現し、20~30%では頭痛(拍動性)、倦怠感があり、30~40%では激しい頭痛、嘔気、嘔吐、視力障害が認められ、40~50%ではこれに加え

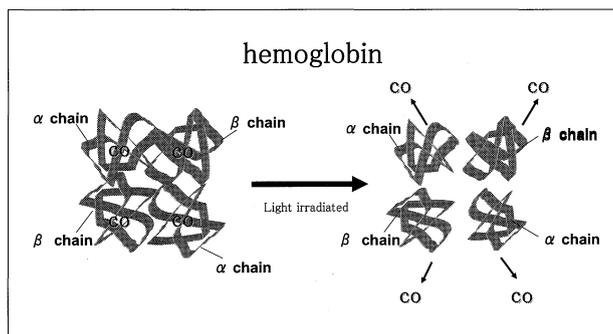


Fig.2 Light irradiation dissociate CO from CO-bound Hb.

呼吸促進，頻脈が出現し，50～60%では昏睡，痙攣から時には死亡に至り，60～70%では上記に加え呼吸微弱となり，70%以上では呼吸停止，循環虚脱，死亡に至るとされている。だが，概ね以上のような関連が認められる場合でも，様々な条件下で来院した患者のCO-Hb比率と臨床症状は必ずしも一致せず予後や重症度も反映しない⁴⁾。これは曝露条件のみならず，病院搬送までの時間が一定しないことも原因の一つと考えられ，出来る限り早い段階での迅速かつ簡便で有効な治療の開発が必要と考えられる。

CO中毒の病態は低酸素障害説 (hypoxic theory) と細胞障害説 (cellular theory) によって説明されている。低酸素障害説はCOの急性中毒の中心的な病態であると考えられており，高気圧酸素療法もこの理論に基づいて行われる。低酸素症はCOがヘム蛋白と結合する事により発症するが，ヘム蛋白としてはヘモグロビン，ミオグロビン，チトクローム類，カタラーゼ，ペルオキシターゼなどがあり酸素運搬，電子伝達系，酸化還元反応を通じて酸素代謝と密接に関連している。まずヘモグロビン (Hb) はCOに対して酸素よりも高い親和性 (酸素の約240倍) を有するため，血中でCOが優先的にヘモグロビンと結合する事により酸素運搬を障害する。4量体タンパク質であるHbに一つでもCOが結合すると他の部分の酸素結合が減少し，ヘム間の相互作用によってCOが結合していない残存Hbの酸素親和性が高まるため，酸素解離曲線は左方へ移動し末梢組織において酸素を放し難くなるので組織への酸素移行がさらに減少し組織酸素代謝が障害される。COは末梢組織

(細胞内) においても前述のミオグロビンやチトクローム類，カタラーゼ，ペルオキシターゼなどと結合し，ミトコンドリアレベルでの酸化的リン酸化を阻害し酸素利用障害を生じる。またKevin R Hardyら⁵⁾によると，CO中毒では心筋自体が障害を受ける事に加え，血管透過性の亢進をきたして循環血液量が減少するため心拍出量が低下し，末梢組織は虚血に陥る。

細胞障害説とは，COにより活性化された多形核白血球が血管外へ遊出して脳組織内で脂質の過酸化を引き起こすという説である。またCOは血小板からの一酸化窒素 (NO) 放出を増加させ，酸素やスーパーオキシドと反応して組織障害を引き起こすとされている⁶⁾。

急性CO中毒において中枢神経系以外のものについては低酸素性障害説によってかなりの部分が説明可能であるが，急性の意識障害と遅発性中枢神経障害の機序については十分に説明されておらず，細胞障害説は注目すべき観点といえるものの，高気圧酸素療法の有効性等，治療に関して統一した見解は得られていない。

このような現状から，CO中毒に対してどこでも誰にでも実施できる初期治療として，100%酸素吸入以外にも有効な治療法が望まれる。光照射という特殊な器具や大掛かりな装置を要しない方法がCO中毒において有効な治療法となれば，臨床に益するところは大きい。

3. 光照射によるCO-Hbの解離機序

Fig.2に示すようにヘモグロビンは $\alpha \cdot \beta$ という構造の類似した2種類のサブユニットそれぞれ2つが組み合わさって構成される $\alpha_2 \beta_2$ タイプの4量体タンパク質である。そしてそれぞれのサブユニットはヘムと呼ばれる鉄含有補欠分子を含み，全体として4個の配位子分子を結合する事が出来る。この配位子分子にCOが1つでも結合すると非常に安定な状態になって酸素を末梢で解離しなくなり，結果として末梢組織での酸素欠乏を引き起こすのがCO中毒の病態の一つである。だがこの安定化したCO-Hbに可視光を照射することで，COとヘムの結合が光解離し，代わって酸素が結合し，COが遊離する。この解離したCOを排出するた

めの換気と十分な酸素があれば、理論上はHbに結合したCOは酸素に置換される^{7) 8)}。

4. 人工酸素運搬体(HbV)について

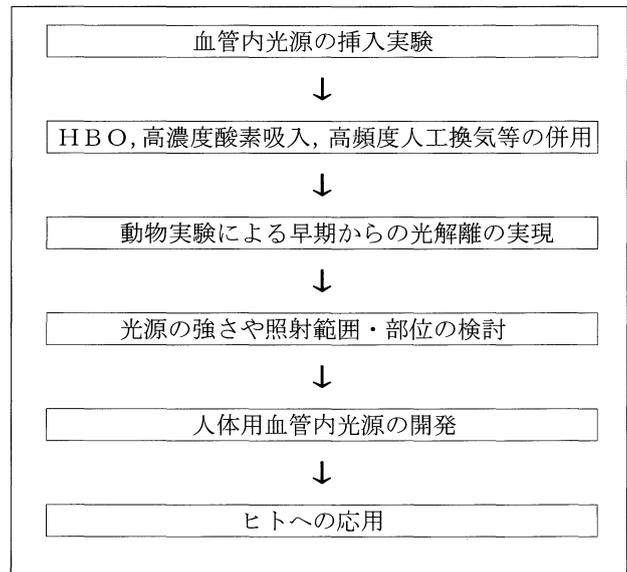
今回我々が使用したHbVは早稲田大学理工学術院と慶應義塾大学医学部との共同研究により開発された製剤であり、ヒトへの実用化に向け種々の検討が行なわれている。HbVは期限切れヒト濃厚赤血球製剤から精製したヘモグロビンをリン脂質二分子膜(リポソーム膜)にて被覆し直すことによって調製される。具体的には混合脂質粉末を高濃度Hb溶液に水和させ、これをエクストルージョン法と言われる方法(ある特定の孔径を有するメンブレンフィルターに高圧をかけて透過させる方法)にて調製する。この孔径を順次小さくすることによって目的の粒子径のHbVを製造することができる。室温で約2年間安定であり、血液型もなく血小板や補体の活性化回避等の安全性を保持しながら酸素輸送効果を示す薬剤である。今回の実験のようにラットへの投与に関しても種々の予備実験により安全性が確認されている^{9) 10)}。

5. 本研究の利点と課題(今後の展望)

現在までにラットを用いたCO中毒の実験が数多くなされているが、曝露容器(デシケーター)にラットを入れCOを曝露させる方法を採用している実験が殆どである。これらの実験系ではCO曝露中の様々なパラメーターを観察することは出来ても、ラット血液の性質上、曝露終了後は結合したCOとHbの解離が速やかに進み、ヒトで問題となるCO曝露後に生じる種々の状態(遷延化するCOとHbの結合等)を観察することは非常に困難であった。(我々も当初このデシケーターにラットを入れCOを曝露する従来の実験方法にCO濃度や曝露時間等、条件を変化させ曝露終了後のCO-Hb経過を追えるような様々な工夫をしたが、満足のいく結果は得られなかった)

そこで今回我々が行った実験は、ヒトのヘモグロビンを内包した人工酸素運搬体を使用することにより、従来の実験では観察し得なかったCO曝露後の経過を容易に観察する事が可能になった。また、これにより光照射がCO-Hbの解離に及ぼす影響を時系列ごとに観察す

Table 2 Vista of application for human



ることが出来た。しかしながら、本実験ではラット体内にヒトヘモグロビンを使用した人工赤血球を投与しており、これ自体がラットのCO中毒を純粹に反映したものとは言いがたい。HbV自体のラットへの安全性は確認されており、今回の実験でも各個体ともCOの解離曲線にばらつきは認められず、死亡例やバイタルサインの差もなかったため、このモデルがラットCO中毒状態をある程度再現性をもって観察できるモデルとして妥当であると判断し実験を行った。しかしながら今後ラット実験に留まらずヒト赤血球での光照射による解離の有効性を検討すべくさらなる実験を行っていく必要があるものと考えられる。

次に光を照射する部位についてであるが、最も効果的な照射部位は光により解離したCOがすぐに呼気中に排出される肺血管床や心腔内であると思われる。ラットのような小動物では胸壁が薄いため、前胸部の皮下を剥離する前処置を行い直接そこに照射する程度で容易にそれらの部位に光が到達し、本実験のように光照射がCO解離を促進しデータ上も有意差を得ることが出来たと考えられる。ヒトへこの光照射を応用する場合(Table 2)、以下に述べる二点が重要な要素となるであろう。

第一に体外からの光照射では光量が不十分であり、血

管内(肺血管・心腔内)へ直接光源を挿入し照射をする必要があると考えられる。この際、1) 光源が熱を発生しない、2) 光源の周囲に血栓を生じない、ということが前提である。我々はラットにおいてまずこの実験を行うべく血栓防止処置を施した光ファイバーを作成済みであり、これを用いたラット用の血管内光源実験を実施し効果を判定する予定である。なお今後実際に人体に応用する際は、現在広く臨床の現場にて一般的に使用されているSwan-Ganzカテーテルに光源を取り付けたものや、循環器領域ですでに使用されている血管内視鏡により強い光源を取り付けた器具を想定しており、実用化されれば高圧酸素療法のような大規模な装置がない施設においても比較的簡便に初期治療が行えるものと考えている。

今回の実験結果では曝露後早期よりCO-Hb比率の改善が得られるものの有意差は90分後でのみ認められた。これは血管内に到達する光量もさることながら、解離したCOが大気自発呼吸のみで排出される状況であったことが原因であると推測される。

二番目として、効果的な光照射に加え効率よく酸素化を行う必要があるものと考えられる。解離したCOを速やかに呼気中に放出し、さらには十分な酸素化を行えば、より大きな効果が得られるものと考えられる。実際、HbVの製造工程においてCOを光照射により解離させる場合、その効率を高めるため、光照射に加え酸素バブリングを行っている。このことから我々は光照射に加え、従来のCO中毒に対する治療である高圧酸素療法や高濃度酸素吸入の併用で相乗効果を得られるのではないかと考えている。また臨床の現場で度々使用される高頻度人工換気(ジェットベンチレーション)も有用ではないかと推測している。そのために今後、酸素単独吸入群と酸素吸入と光照射を併用した群でのCOの解離率を観察する様々な実験を実施する予定である。ラット実験にてさらに効率のよい酸素化や光の照射法を見出すことが出来れば、実用に向けた足がかりになるであろう。

結語

1. 今回我々は光照射がCO-HbからCOを解離させるという性質に着目し、ラット体内でも光照射によりこの解離を促進するという結果を得た。
2. ヒト由来のHbを内包したHbVをラットに投与することにより、ラット血単独では観察しにくいCO曝露後のCO-Hb比率の経時変化を容易に観察することが出来るようになった。
3. CO中毒に対する現行の主たる治療は高圧酸素療法や高濃度酸素吸入であるが、これに加え光照射治療という新たな可能性が示唆された。
4. 今後光照射を臨床に応用するためには、より多くの光量を確保するため血管内挿入型の光源の開発やHBOや高濃度酸素吸入等の現行法との組み合わせが必要であると考えられた。

謝辞

ヘモグロビン小胞体(HbV)は、土田英俊 名誉教授(早稲田大学理工学術院)らと慶応大学医学部が共同で開発したものである。

本論文作成にあたり酒井宏水 准教授(早稲田大学理工学術院)のご指導に対し感謝の意を表す。

引用文献

- 1) 上条吉人：なぜ、今一酸化炭素中毒か.中毒研究 2006;19:11-12.
- 2) 長谷川正紀：血中COHbの致死性的および非致死性的濃度：空气中CO濃度との相関に関する動物実験.J.Forensic Toxicol 2002;20:320-327
- 3) 上田康晴：日本における一酸化炭素中毒の疫学的変遷.中毒研究2006;19:13-21.
- 4) 上村公一：一酸化炭素中毒.日本医事新報2003; 4154:23-28.
- 5) Hardy KR, Thom SR：Pathophysiology and treatment of carbon monoxide poisoning. Clinical Toxicology 1994; 32:613-629.
- 6) 嶋津岳士：一酸化炭素中毒の病態.中毒研究 2006;19:23-33.

- 7) 鄭主恩,濱田健一,酒井宏水,武岡真司,土田英俊:
ヘモグロビン液膜のカルボニルヘモグロビンから
オキシヘモグロビンへの配位子交換. 日本化学会
誌 1995(2);123-127.
- 8) Shinichi Adachi: Direct observation of
photolysis-induced tertiary structural
changes in hemoglobin. Proc Natl Acad Sci
USA 2003;12: 7039-7044.
- 9) Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K,
Tsuchida E: Haemoglobin-vesicles as
artificial oxygen carriers: present situation
and future visions. J Intern Med. 2007; 263: 4
-15.
- 10) 武岡真司: 分子集合科学を利用した人工血液の
創製.人工血液2005;Vol13:136-147.