

## 目 次

# 人工血液

第9巻 第1号 2001年3月

卷頭言 .....	小林紘一	1
総説 人工酸素運搬体を用いた液体換気について .....	堀之内宏久	2
原著 一酸化炭素吸入時の血圧低下機構の研究： Pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate(PHP) およびN <sup>G</sup> -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)による NOの部分的関与の証明 .....	大下敏隆	6
トピックス 赤血球代替物の臨床応用の可能性 .....	照屋 純	23
海外文献紹介 トランスジェニック植物由来ヒトヘモグロビン .....	津田良夫	27
学会報告 第8回血液代替物国際会議 .....	宗 慶太郎	30

## Contents

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 9 No. 1 March, 2001

President's Message.....	Koichi Kobayashi	1
Review: Liquid ventilation using artificial oxygen carrier .....	Hirohisa Horinouchi	2
Original Article: Study on the hypotension induced by carbon monoxide inhalation: Partial participation of nitric oxide (NO) evidenced by pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP) and N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) .....	Toshitaka Ohshita	6
Topics: The potential of red blood cell substitutes in the clinical settings.....	Jun Teruya	23
Human haemoglobin from transgenic plant.....	Yoshio Tsuda	27
Report: VIII <sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (VIII-ISBS) .....	Keitaro Sou	30

## 会告

# 第8回日本血液代替物学会年次大会

### テーマ

## 「血液代替物をめぐる諸問題」 —臨床応用を目指して—

大会長：清水 勝（東京女子医科大学輸血科教授）

会期：2001年9月4日(火), 5日(水)

会場：シェーンバッハ・サボー

〒102-0093

東京都千代田区平河町2-7-5

応募用紙：人工血液2001年第9巻1号に綴じ込み  
(又は下記にご請求下さい)

演題募集：一般演題（口演）

演題締切：2001年6月2日(土)

演題送付先・連絡先

：〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1

東京女子医科大学 輸血科

第8回日本血液代替物学会年次大会

事務局 藤井 寿一

近藤 恵美子

TEL: 03-3353-8111 内線 37231, 37232

FAX: 03-5269-7360

## 巻頭言

日本血液代替物学会会長  
慶應義塾大学医学部外科（呼吸器外科）  
小林 紘一



二十一世紀を迎えました。新世紀、新千年紀のスタートといつても単なる時間軸上の移動ではないかと冷めた言いかたもできますが、激動の時代と言われた二十世紀を振り返り、また、これから起こるであろう予想しうる変化、あるいは予想もつかないような変化革新もあるかも知れないとと思うと緊張し身の引きしまる感じがします。次世紀に何を伝えられるか、何を遺せるかは私たちの最大の関心事と言えます。

十九世紀後半も含め、二十世紀は自然科学に大きな進歩発展をみ、数多くの発見や発明がありました。血液学の領域でもK. Landsteinerによる血液型の発見と輸血学の確立という医学史の上でもさん然と輝く大きな功績があります。輸血は一種の臓器移植と言えますが、重要臓器の機能不全に対しては移植の他に人工臓器による対処法があるように、血液学の領域でも人工赤血球や人工血小板に関する興味が世界的に高まっています。

本邦でも日本血液代替物学会が設立されましたが、本年日本血液代替物学会は清水勝大会長のもと第8回目の学術大会を迎え、また機関誌の「人工血液」も第9巻を発行するまでに成長してきました。投稿論文の内容も毎年レベルが上昇し、世界の研究をリードしているといっても過言ではありません。世界に先がけて臨床応用可能なものを作製するには医学、理工学そして産業（企業）の共同作業が重要となります。現在の問題点の一つは企業との協力体制をどのように構築し、量産化を図るかということだと思います。今後、技術革新や遺伝子工学、再生医学、材料工学などの分野の進歩を取り入れながら、機能や生体適合性に優れた人工酸素運搬体、人工血小板や蛋白製剤などの開発に拍車がかかることが期待されます。

臨床応用可能な血液代替物の開発には生体の機能の複雑さに関する理解を深めるとともに再度医学、理工学そして企業（産業学）が一致協力して開発意欲を燃やすことが必要であることを強調したいと思います。そのためには本学会の役目がますます重要になります。

二十一世紀における進歩発展に期待がふくらみます。

# 人工酸素運搬体を用いた液体換気について

## Liquid ventilation using artificial oxygen carrier

堀之内宏久, 田島敦志, 小林紘一  
Hiroyisa Horinouchi, Atsushi Tajima, Koichi Kobayashi

### 和文抄録

急性肺傷害や成人型呼吸窮迫症候群の治療の研究は近年目を見張るものがあるが、臨床面で予後の改善はまだ不十分である。特に呼吸管理の面で進歩が認められるものの新しい呼吸管理を適用しても治療に反応しない症例があることも事実である。このような症例に対し、膜型肺が用いられているが、治療成績は良いとはいえない。液体換気は、肺胞領域のガス交換を人工酸素運搬体を介して液相一液相間で行おうとする非生理的な換気方法であり、その意味で画期的な治療法である。液体換気は1960年代から開発研究が進んでいる。液体換気の方法として完全液体換気と部分液体換気という方法が開発されている。研究は、液体換気に用いられるパーカーフルオロカーボンの改良、液体換気に用いられる呼吸器の開発、液体換気の導入と離脱の方法、薬剤の生体に与える影響、薬物動態など多方面からの研究が進んでいる。液体換気による治療法はまだ実験的治療の域を出ないが、呼吸の維持、管理の点で改良が加えられ、現在パーカーフルオロカーボンを用いた部分液体換気による第II相試験が進んでいる。パーカーフルオロカーボンによらない部分液体換気の研究も行われており、今後の研究の展開により急性肺傷害に対する新たな治療法として臨床に応用される日も近いと考えられる。

### Abstract

In spite of rigorous investigation of acute lung injury, there still exist some cases which don't respond to conventional therapeutic modality. Several advanced mode of ventilation technique cannot improve gas exchange, pulmonary mechanics in those patients. For this group of acute lung injury, Extra Corporeal Membrane Oxygenation is another treatment option, although therapeutic effect is limited. To improve survival from severe acute lung injury, liquid ventilation using artificial oxygen carrier has been investigated since 1960s. Perfluorocarbon is usually used as an oxygen carrier. There are several chemical compounds, which showed different characteristics in surface tension, vapor pressure, oxygen solubility and CO<sub>2</sub> solubility. There has been investigated two ventilation technique of liquid ventilation, TLV (Total Liquid Ventilation) and PLV (Partial Liquid Ventilation). In selected facility, PLV using Perfluburon™ is now under Phase II trial and pharmacokinetics and safety of administration has been proved. Other than perfluorocarbon, there is a group that investigates the PLV using a sort of liposome-encapsulated hemoglobin. In the near future, we can use liquid ventilation as an effective therapeutic modality for severe acute lung injury.

### Keywords

liquid ventilation, perfluorocarbon, artificial oxygen carrier, acute lung injury, liposome-encapsulated hemoglobin

### はじめに

人工酸素運搬体の開発は大変な労力と資金を用いて開発が進んでおり、臨床応用を目指した研究が進んでいる。人工酸素運搬体の開発の目的の第一は赤血球代替物の開発であるが、その他にも呼吸不全に対する液体換気への応用、移植臓器における虚血再灌流障害の軽減、癌治療への応用、腹膜灌流など応用範囲は広く人工酸素運搬体も目的に応じて開発が進められている。

さて、液体換気は呼吸不全の治療目的で研究が進んでいる。急性の呼吸不全は人工呼吸器を用いた呼吸管理の進歩により生

存率の上昇が認められているが、人工呼吸器の多様な換気様式を駆使しても血液の酸素化が不十分となり死亡する症例も少なくない。人工呼吸器で治療効果のあがらない症例に対し、ECMOや液体換気を用いた治療による成績の向上が研究されている。液体換気は現在Phase IIIまで研究が進み、通常の治療に反応しない急性呼吸不全症例におけるブレーカスルーとなる可能性が出てきた。

## ○研究の歴史

傷害を受けた肺内を洗浄することによってガス交換の機能を回復する概念は第一次世界大戦時に起こった<sup>1)</sup>が、呼吸不全を改善するには不十分であった。生食を満たした肺のガス交換や循環状態の変化は1960年代から70年代にかけて研究され、高圧酸素状態では、生食による液体換気で生命を維持することが可能であることをKylstraらが示した<sup>2)</sup>。しかし、二酸化炭素の排出、アシドージスの補正などの点で解決の困難な問題点が残されていた<sup>3)</sup>。

perfluorocarbon（以下PFC）は化学的に安定な液体を作成する目的で第二次世界大戦中に開発され数多くの化合物が合成された<sup>4)</sup>。PFCは酸素と二酸化炭素の溶解度が非常に高く、表面張力が低く、水や脂肪に溶けにくい性質を持っていることが明らかとなり、ガス交換の媒体となる可能性が示唆された<sup>5)</sup>。1966年にClarkとGollanが酸素で飽和したPFC（FC-75, 3M Company）内でマウスが自発呼吸で18時間生存可能で、しかも大気に戻しても生存することを発表してからPFCを用いた液体換気の臨床応用に向けて研究が始まった<sup>6)</sup>。彼らは猫の人工換気にもPFCを用い、一時的な生存を確認している。

その後の研究で、PFCの種類によらず、人工換気は可能であるが、離脱時に障害が起こることを報告している<sup>7)</sup>。

## ○PFCの特徴と種類

現在研究、臨床に使用されるPFCは数種類があるが、その骨格は炭化水素の水素基の部分をフッ素、あるいはフッ素の化合物で置き換えたもので、無色透明で熱や酸に安定で、生物学的にも安定でin vitroでは細胞に影響を及ぼさない。ClarkとGollanらはFC-75と呼ばれるPFCをはじめ、蒸気圧の異なる数種類のPFCを用いた<sup>6,7)</sup>が、長期投与で気道内出血が起こることを報告しPFCの改良が必要とされていた。液体換気の研究に用いられるPFCは数多くあり、主なものを表1に記した。いずれもPFCの特徴を有し、50mL/dL程度の酸素と210mL前後の二酸化炭素を溶解する。

Table. 1

### Perfluorochemicalの特徴

	FX-80	FC3280	PF5080	Perflubron	Caroxin-D	Caroxin-F
比重 (g/mL)	—	1.75	1.76	1.92	—	—
表面張力 (dynes/cm at 25C)	—	12	15	18	—	—
酸素溶解能 (mlgas/100mL liquid at 37C)	—	40	49	53	—	—
二酸化炭素溶解能 (mlgas/100mL liquid at 37C)	—	192	176	210	—	—
蒸気圧 (Torr at 37C)	58	61	6.8	11	12.8	29.1
化学式	C <sub>8</sub> F <sub>16</sub> O	C <sub>8</sub> F <sub>18</sub>	C <sub>8</sub> F <sub>18</sub>	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> Br	C <sub>10</sub> F <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>9</sub> F <sub>20</sub> O
製造者	3M	3M	3M	Alliance	Allied Chemical	Allied Chemical

## ○テクニック

液体換気を行うには回路全体に液体を充填し、肺内の液体を入れ替えることによってガス交換を行う完全液体換気Total Liquid Ventilation (TLV) と、FRC部分のみに液体を充填し、気体で換気を行う部分液体換気Partial Liquid Ventilation (PLV) に分けられる。また、本来の液体換気とは異なるが、PFCを用いたLavageも臨床応用の対象となっている。

Greenbergらは呼吸不全に陥り膜型肺(Extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) を必要とする新生児にTLVを行い、酸素化したPFCを重力によって気道内に注入し、サイホンの原理により排出する方法を取ったが<sup>11)</sup>、液体換気を長期間継続するためには注入と排出の量、時間を制御できる装置が必要とされた<sup>12)</sup>。Hirschlらはローラーポンプとピンチコックバルブで流入と流出を制御する液体換気装置(Liquid Ventilator)を開発した<sup>13)</sup>。この装置を用いれば、肺内の分泌液の排除は容易で、肺内が一様な条件でガス交換を行える利点がある<sup>14)</sup>が、二酸化炭素を除去する回路を設けなければならないこと、経時的にVentilatorより大気に蒸発する量と体内へ吸収される量を補充せねばならず、患者ごとの調整も必要で管理が複雑である<sup>15)</sup>。現在はマイクロコンピューターを組み込んだ装置が試作されている。

一方、PLVはPFCをFRCのレベルまで気道内に注入した後に現在あるレスピレーターで通常の換気方法を用いて換気を行い、ガス交換を行うもの<sup>16)</sup>でFuhrmanらが提唱し、研究が開始された。PLVはLiquid ventilatorのような特殊な機材を必要とせず、大気中に失われるPFCや体内に吸収されるPFCを厳密に補充せずともよい利点を持っている。

## ○液体換気の生理

空気で換気される肺では、換気の点では肺胞内圧は一定で閉塞がなければ一様に換気されると考えてよいが、肺血流は動脈圧と重力の和によって分布に偏りがある。このため、換気血流比に著しい不均等があると血液ガスの悪化をまねく。また、肺胞腔は表面張力を低下させるサーファクタントによって気腔を開存させており、サーファクタントの機能不全や量の減少によって肺胞腔は虚脱し、ガス交換が不可能になる。一方、液体で換気された場合肺全体の血流はほぼ一様となり、また、肺胞内を液体を満たして換気することにより肺血管は一様に進展するため、換気血流比が改善すると言われている<sup>8)</sup>。また、気相と液相の界面が消失するために表面張力の低下によりつぶれていた肺胞が拡張するため、ガス交換の改善がえられる。このほか、生理的食塩水やPFCを用いた液体換気の手法を用いた肺の生物物理学的研究は継続され、重要な知見が集積された<sup>9,10)</sup>。

## ○前臨床研究

液体換気がガス交換の有望な手段であることは70年代の基礎的な研究から明らかとなったが、臨床への応用は1990年代になるまで進まなかった。これは、気道系に液体を注入することへの抵抗感があるのと、液体換気を開始する際に注意深く呼吸器を設定しないとガス交換の悪化が起こるためであった。現在では一部の施設でPhase IIの臨床研究が進み、その有効性が明らか

となってきた。

液体換気が長期の臨床使用に耐えられる治療法であることを証明するために実験動物を用い種々のモデルを通して液体換気の有効性と副作用の程度についての研究が精力的に行われている<sup>17)</sup>。TLVでは、Liquid Ventilatorの開発<sup>12)</sup>から、初期投与の方法<sup>18)</sup>、TLV中の管理、離脱の方法<sup>19)</sup>などがWolfson, Shaffer, Hirschlらを中心に研究されている。

また、PLVに関しても1990年代から多くの研究者が種々の実験モデルを用いて良好な成績を報告している<sup>20,21)</sup>。

とくにPLVにおいては、生食による洗浄によって肺表面活性物質を取り除いたモデル<sup>22)</sup>、オレイン酸を血管より注入して作成した急性肺傷害モデル<sup>23)</sup>、をはじめ、新生児期の動物の横隔膜ヘルニアモデルを用いた研究<sup>24)</sup>も行われ良好な成績が報告され、臨床応用への期待が高まっている。液体換気を施した後に液体換気より離脱せしめ、10年間に渡り生存させた動物(犬)の体内のPFCの残留および組織学的な検索をおこなった研究が最近になりHoodとModellによってなされ、蒸気圧が高く蒸発しやすいPFC(FX-80)では離脱後1週間で低酸素血症や呼吸不全を起こすが、蒸気圧が低く、蒸発しにくいPFC(Caroxin-D)では、肺胞内や肺間質へのマクロファージの集積が20ヶ月も持続し、5年間にわたって細気管支周囲のマクロファージ内にPFCが残存したと報告している。蒸気圧の中等度のPFCを用いた場合、10年後の肺構造には何も変化を及ぼさなかったとしている。著者らは、10年間の観察で、PFCが生物学的にまったく反応性がないと結論付けているが、今後臨床試験での長期間観察が必要であることを示唆した<sup>25)</sup>。

また、PFCではない人工酸素運搬体であるリポソーム包埋ヘモグロビンを用いたPLVの研究も行われており、実験室レベルでは、ガス交換と肺メカニクスの改善が認められており、今後の研究の進行が期待される<sup>26)</sup>。

また、気道内からPFCを注入することによって移植肺の保存時間が延長できるかについての研究では、血管内をLow potassium dextrose液で灌流した後に保存した肺より酸素化、組織構築の維持の面で劣っていることが報告された<sup>27)</sup>が今後他の治療の補助手段として使用される可能性がある。

### ○Clinical studiesの現況と将来

液体換気の対象となる疾患は通常の人工呼吸器を用いた換気方法では改善が望めない症例であり、現在のところ新生児に認められる先天性横隔膜ヘルニアによる肺形成不全、胎便吸引やIRDS等の呼吸不全症例で呼吸器での管理が困難となった症例に適応があると考えられている。

液体換気の対象となる症例が原因、病像の程度がさまざまであり、呼吸器による管理の限界であることの判断が一定していないことなどから、まとまった大規模な臨床研究はまだ開始されていないのが現況である。小児の呼吸不全では数施設で、独自の臨床試験を行っている<sup>28-30)</sup>。Greenspan Wolfsonのグループは1990年に3例の未熟児に起きた呼吸不全に対しPFCの一種であるRimar101によるTLVを行い、2例に血液の酸素化の改善を認め、TLVの導入と離脱が安全に可能であることを示した。

しかし、全例ともにTLVから離脱後に死亡した<sup>28)</sup>。Pranikoff, Hirschlらは呼吸不全を呈し、体外循環が必要な先天性横隔膜ヘルニアを伴う新生児4例にPLVを行いガス交換と肺コンプライアンスの上昇を認めPLVの導入、離脱は容易であったと報告し、さらに4例中2例が生存し、生命予後の改善につながる症例もあることが報告されている<sup>29)</sup>。

成人型の呼吸急迫症候群に対する適応は現段階では実験動物による検証を行っている段階であり、1施設でPhase I / II studyが行われたのみである<sup>31,32)</sup>。Hirschlらは膜型肺の必要な10例の成人の呼吸不全症例にPerflubron(Liqui Vent™)を用いたPLVを行い、6例で有効、5例が生存したと報告し、ガス交換の改善と肺コンプライアンスの上昇につながると結論づけた。この報告は第一相試験であった<sup>30)</sup>。彼らはPLVの安全性は確立されたと考え、さらに無作為の第一／二相試験を18人の18歳以上の呼吸不全症例に部分液体換気を行いPFC(Perfluburon)の吸収、排泄、代謝について検討し、ほとんどの排泄は呼気から行われることを示した<sup>33)</sup>。治療成績については詳述されておらず、今後の研究の進展が期待される。

### 今後の展望

液体換気の生理学的变化、PFC投与による生体の適応、PFCの代謝、液体換気離脱時の問題点など基礎的な研究は着実に進行している。膜型肺を使用せざるを得ない呼吸不全症例での、液体換気を行った場合の病像の変化と治療効果についての知識が集積されつつある。

呼吸不全に対する治療法としては液体換気は大変魅力のある方法であり、今後適応を決めて臨床試験を行い、新たな治療法のひとつとして確固たる地位を築く日も遠くないと思われる。

### Reference

1. Winternitz MC, Smith GH. Preliminary study in intratracheal therapy. In Winternitz MC (ed) Pathology of war gas poisoning, New Haven, Yale University, 1920, p144.
2. Kylstra JA, Nantz F, Crowe J, Wagner W, Saltzman A. Hydraulic compression of mice to 166 atmospheres. Science 1967;158:793-4.
3. Kylstra JA. Advantages and limitations of liquid breathing. In Kylstra JA (ed) Proceedings of the third symposium on underwater physiology, Baltimore, Williams & Wilkins, 1967, p341.
4. Sargent JW, Seffle RJ: Properties of perfluorinated liquid. Fed Proc 1970;29:1699-1703.
5. Lowe KC. Perfluorocarbons as oxygen transport fluids. Comp Biochem Physiol 1987;87A:825.
6. Clark LC, Gollan F: Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. Science 1966;152:1755.
7. Gollan F, Clark RM. Experimental pathology after respiration and injection of various fluorocarbon liquids Exp Med Surg 1968; 26:249-262

8. West JB, Dollery CT, Matthews CME, Zardini P. Distribution of blood flow and ventilation in saline-filled lung. *J Appl Physiol* 1965;20:1107-1117.
9. Gil J, Bacofen H, Gehr P, Weibel ER. Alveolar volume surface area relation in air and liquid filled lungs fixed by vascular perfusion. *J Appl Physiol* 1979;47:990-1001.
10. Schurch S, Georke J, Clements JA. Direct determination of surface tension in the lung. *Proc Natl Acad Sci* 1976;73: 4698-4702.
11. Stavis RL, Kaplan GS, Cox C, Wolfson MR, Shaffer TH. Liquid ventilation (LV): Comparison of pressure vs. flow regulated ventilation strategies. *Pediatr Res* 1994;35:A377.
12. Hirschl RB, Merz SI, Montoya JP, Parent A, Wolfson MR, Schaffer TH, Bartlett RH. Development and application of a simplified liquid ventilator. *Crit Care Med* 1995;23:157-163.
13. Wolfson MR, Heckman J, Cox C, Shaffer TH. Liquid ventilation equipment and methodology: A historical perspective. Keystone, CO: 11th annual CNMC ECMO symposium, 1995.
14. Greenspan JS, Cleary GM, Wolfson MR. Is liquid ventilation a resonable alternative? *Clinics Perinat* 1998; 25:137-157.
15. Wolfson MR, Greenspan JS, Shaffer TH. Liquid assisted ventilation: an alternative respiratory modality. *Pediat Pulmonol* 1998;26:42-63.
16. Fuhrman BP, Paczan PR, DeFrancis M. Perfluorocarbon associated gas exchange. *Crit Care Med* 1991;19:712-722.
17. Hirschl RB, Parent A, Tooley R, MaRacken M, Johnson K, Shaffer TH, Wolfson MR, Bartlett RH. Liquid ventilation improves pulmonary function, gas exchange, and lung injury in a model of respiratory failure. *Ann Surg* 1955;221:79-88.
18. Wolfson MR, Tran N, Bhutani VK, Shaffer TH. A new experimental approach for the study of cardiopulmonary physiology during early development. *J Appl Physiol* 1988; 65:1436-1443.
19. Shaffer Th, Foust R, Millar TF, Wolfson MR. Perfluorochemical (PFC) elimination from the respiratory system. *FASEB J* 1995;9:A17.
20. Tutuncu AS, Faithful NS, Lachmann B. Comparison of ventilatory support with intratracheal perfluorocarbon administration and conventional mechanical ventilation in animals with acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:785-792.
21. Hernan LJ, Fuhrman BP, Kaiser RE, Penfil S, Foley C, Papo MC, Leach CL. Perfluorocarbon-associated gas exchange in normal and acid injured large sheep. *Crit Care Med* 1996;24: 475-481.
22. Tutunk AS, Faithful NS, Lachmann B. Intratracheal perfluorocarbon administration combined with mechanical ven-
- tilation in experimental respiratory distress syndrome: Dose dependent improvement of gas exchange. *Crit Care Med* 1993;21:962-969.
23. Papo MC, Paczan PR, Fuhrman BP, Steinhorn DM, Hernan LJ, Leach CL, Holm BA, Fisher JE, Kahn BA. Perfluorocarbon-associated gas exchange improves oxygenation, lung mechanics, and survival in a model of adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1996;24:466-474.
24. Major D, Cadenas M, Cloutier R, Leclerc S, Fournier L, Shaffer TH, Wolfson MR. Morphometrics of normal and hypoplastic lungs in preterm lambs with gas and partial liquid ventilation. *Pediatr Surg Int* 1997;12:121-125.
25. Hood CI, Modell JH. A morphologic study of long term retention of fluorocarbon after liquid ventilation. *Chest* 2000; 118:1436-1440.
26. 田島敦志, 堀之内宏久, 川村雅文, 渡辺真純, 澤藤誠, 河野光智, 儀賀理暉, 桑原克之, 岩丸有史, 安彦智博, 小林絢一. 人工酸素運搬体NRC (Neo Red Cell) を用いた部分液体換気の有効性についての検討. *日外会誌* 1999;100suppl:137.
27. Loehe F, Mueller C, Bittmann I, Messmer K, Schildberg F. Influence of long term preservation with endobronchially administered perfluorodecalin on pulmonary graft function Transplantation 2000; 70:1412-1424.
28. Greenspan JS, Wolfson MR, Rubenstein SD, Shaffer TH. Liquid ventilation of human preterm neonates. *J Pediatr* 1990; 117:106-111.
29. Plainkoff T, Gauger G, Hirschl RB. Partial liquid ventilation in newborn patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1996;31:613-618.
30. Meaney JF, Kazerooni EA, Garver KA, Hirschl RB. Acute respiratory distress syndrome: CT findings during partial liquid ventilation. *Radiology* 1997;202:570-573.
31. Hirschl RB, Plainkoff T, Wise C, Overbeck MC, Gauger P, Schreiner RJ, Dechert R, Bartlett RH. Initial experience with partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 1997;10:463-468.
32. Bartlett R, Croce M, Hirschl RB, Gore D, Wiedermann H, Davis K, Zwischenberger. A Phase II randomized, controlled trial of partial liquid ventilation (PLV) in adult patients with acute hypoxic respiratory failure (AHRF). *Crit Care Med* 1997;25:A135.
33. Reickert CA, Pranikoff T, Overbeck MC, Kazerooni EA, Massey KD, Bartlett RH, Hirschl RB. The pulmonary and systemic distribution and elimination of Perflubron from adult patients treated with partial liquid ventilation. *Chest* 2001;119:515-522.

# 一酸化炭素吸入時の血圧低下機構の研究： Pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP)およびN<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)による NOの部分的関与の証明

Study on the hypotension induced by carbon monoxide inhalation: Partial participation of nitric oxide (NO) evidenced by pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP) and N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)

大下敏隆, 古川勝雄, 服藤恵三  
Toshitaka Ohshita, Katsuo Furukawa, Keizou Harafuji

## 和文抄録

本研究は、一酸化炭素(CO)吸入による血圧低下に一酸化窒素(NO)が関与するか否かを、NO捕捉作用を示すpyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate(PHP)とNO synthase阻害作用を示すN<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)を用いて検討することを目的とした。雄性日本白色種ウサギをurethane麻酔下に、血圧は右大腿動脈カニューレを介して測定し、PHP(1.2g/20mL/kg/30min)あるいはL-NAME(0.03-30mg/kg)の投与はCO毒性ガス(O<sub>2</sub> 5.0%, CO<sub>2</sub> 16.0%, CO 1.8%, N<sub>2</sub> 77.2%)の吸入前に右大腿静脈カニューレを介して行った。NOの産生量は血漿中の亜硝酸イオン・硝酸イオン濃度の蛍光分析測定により、二つの非蛋白結合性遊離総量をもって推察した。また、PHPおよびL-NAMEの作用にNOが係わっていることの確認のためにacetylcholine(ACh)による血圧低下および摘出血管(胸大動脈、陰茎海綿体)弛緩作用へのPHPおよびL-NAMEの抑制効果を比較検討した。

CO毒性ガス吸入による血圧低下の速度はPHPとL-NAMEの両方で有意に低下した。また、PHPとL-NAMEは、COによる血漿中遊離NOの増加を抑制した。AChの血圧低下実験では、その最大値に対しPHPは影響せず、L-NAMEは若干の抑制を示したが、AChの血圧低下からの半分回復時間(T<sub>1/2</sub>)に対し、PHP、L-NAMEともに短縮を示した。摘出血管標本では、PHPはAChによる弛緩を単独で濃度依存的に抑制するばかりではなく、L-NAMEとの併用は相乗的な抑制を示した。L-arginineはL-NAMEによるACh誘発血管弛緩の抑制を回復させたが、PHPによる抑制には影響しなかった。

以上の結果は、COによる血圧低下にNO産生が部分的に関係すること、およびPHPとL-NAMEはそれぞれNOの捕捉とNO synthase阻害作用によって、COによる血圧低下を抑制することを示唆する。

## Abstract

This study was aimed at investigating whether nitric oxide (NO) could participate in carbon monoxide (CO)-induced hypotension, and pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP) and L-NAME with respective NO capturing and NO synthase inhibitory effects might prevent the CO-induced hypotension. Blood pressure was measured via right femoral artery of male Japanese white rabbits under anesthesia with urethane. The rabbits were intravenously pretreated with PHP (1.2g/20mL/kg/30min) or L-NAME (0.03-30mg/kg) via right femoral vein before inhalation with a toxic gas (O<sub>2</sub> 5.0%, CO<sub>2</sub> 16.0%, CO 1.8%, N<sub>2</sub> 77.2%). Plasma free nitrite/nitrate levels for NO generation were measured by fluorometric assay. In order to confirm the participation of NO in PHP

東邦大学医学部薬理学教室 〒143-8540 東京都大田区大森西5-21-16 Department of Pharmacology, Toho University School of Medicine, Omori-Nishi 5-21-16, Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan.

論文受付 2001年2月13日 受理 2001年2月27日

and L-NAME effects, inhibitory effects of PHP and L-NAME were comparatively evaluated on acetylcholine-induced hypotension and acetylcholine-induced relaxations of isolated thoracic aorta and corpus cavernosum penis preparations in rabbits. The hypotensive velocity in the toxic gas inhalation was significantly reduced by both PHP and L-NAME. They also decreased the CO-induced increase of plasma NO. PHP did not affect the maximal hypotension caused by acetylcholine but L-NAME significantly decreased it. However, both of PHP and L-NAME significantly shortened the half recovery time ( $T_{1/2}$ ) from the maximal hypotension caused by acetylcholine. In the isolated vascular preparations, acetylcholine-induced relaxation was inhibited synergistically by PHP with L-NAME as well as concentration-dependently by PHP alone. L-Arginine restored the inhibition by L-NAME of the acetylcholine-induced relaxation, but not that by PHP. The above results suggest that NO generation participates partially in the CO-induced hypotension, and PHP and L-NAME prevent the CO-induced hypotension via their respective NO capturing and NO synthase inhibitory effects.

## Keywords

carbon monoxide (CO), CO intoxication, pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP), nitric oxide (NO), NO capturing,  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), nitric oxide synthase (NOS), NOS inhibition

## 1. はじめに

火災時には、建材や有機系材料を使用した製品などの熱分解、不完全燃焼により一酸化炭素(CO)、二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)、二酸化窒素を中心とする窒素酸化物、シアンガス、塩化水素などの有毒ガスが発生する<sup>1)</sup>。さらに、燃焼時の酸素消費による酸素欠乏状態が重なり、生命に危険な環境を形成する。このような環境においては、COによる中毒が最も危険である。私達はCO<sub>2</sub>がCOによる死亡を増強することを明らかにしてきた<sup>2,3)</sup>。

COは、様々な材料の燃焼時に発生<sup>4)</sup>し、生体内で種々の系に影響を及ぼし、中毒を生じる。脳神経系に対する影響では、重症の急性中毒の場合は昏睡から死に至る。また、急性中毒の発症後数時間から数日を経て脳浮腫による神経症状が出現して死に至る場合もある。さらに、中毒後数日から数週間を経過して死亡する間歇型CO中毒は、脱髄病巣の進行と神経細胞の連続死によって起こると考えられている<sup>5)</sup>。一方、心臓も脳とともに障害されやすく、重症例では心不全、虚血性変化を呈しやすい。さらに、血圧低下や頻脈、不整脈なども発現する<sup>6)</sup>。

COは組織に対し、次の3つの機序によりO<sub>2</sub>供給を抑制し組織低酸素症を生じる：1) COはhemoglobin (Hb)との結合力が酸素(O<sub>2</sub>)と比較して約200倍強く、COを含有する空気を吸入した場合には、COとO<sub>2</sub>の分圧の割合に応じてHbの一部はCOHbとなり、HbによるO<sub>2</sub>運搬能が減少する；2) COHbはO<sub>2</sub>とHbの親和性を増加させoxyhemoglobin (HbO<sub>2</sub>)からの酸素の解離を抑制する<sup>7)</sup>ので毛細血管まで運ばれたHbO<sub>2</sub>からO<sub>2</sub>解離をしにくくし、組織はO<sub>2</sub>を有效地に利用できなくなる；3) COは細胞内のcytochrome C oxidaseと結合して、細胞によるO<sub>2</sub>消費を妨げる。低酸素症に陥った組織は機能不全から死を惹起する。これらが中毒症状発現の一因となっている<sup>5)</sup>。

組織呼吸を抑制するcyanide化合物の毒性に対しnitric oxide synthase (NOS) 阻害薬投与がその死亡率低下や延命に効果があることから一酸化窒素(NO)の関与が示唆されている<sup>8,9)</sup>。一方、CO中毒による脳障害においては、脳内のnitrotyrosineが増加し、この増加がNOS阻害薬である $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)で抑制されることから、COによる脳障害においてもNOの関与が示唆されている<sup>10-12)</sup>。

CO中毒の救急処置の基本は、低酸素状態の改善にあり、酸素吸入に加え高圧酸素環境下で血中O<sub>2</sub>分圧を上昇させCOHb濃度を低下させることを目的とした高圧酸素(HBO)療法が一般的に行われている。さらに、HBO療法は間歇型CO中毒の治療および予防にも効果を示している<sup>5,7,13)</sup>。

CO中毒の治療法の一つとして、血液代替としてのHb修飾体が、O<sub>2</sub>供給、CO除去の手段としてその効果が期待されている<sup>14,15)</sup>。Hb修飾体は、酸素運搬能を有する血液代用として期限切れヒト赤血球から得られたstroma-free hemoglobin (SHb)を化学修飾して開発され、その一つとしてpyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate (PHP)<sup>16,17)</sup>、diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCL Hb<sup>18)</sup>、 $\alpha\alpha$  Hb<sup>19)</sup>などがある。Hb修飾体の存在は、血液型の判別、クロスマッチなどに要する時間のロス、時には患者への感染の問題、さらには短い血液保有期間、緊急への対応の遅れなどの問題を解決する可能性を示している。

PHP、DCL Hb、 $\alpha\alpha$  Hbおよび化学修飾をしていないSHbに血圧上昇作用があることが認められている<sup>17-19)</sup>。一方、私達はCO吸入による血圧低下の回復をPHPが促進することを報告した<sup>14,15)</sup>。CO中毒へのPHPの治療効果は、O<sub>2</sub>運搬能の改善と抗血圧低下作用の両面から期待される可能性がある。PHPの昇圧作用は、 $\alpha_1$ 受容体拮抗薬prazosin、 $\beta$ 受容体拮抗薬propranololおよびcyclooxygenase阻害薬indomethacinで拮抗されず、L-NAMEで拮抗され、その拮抗がL-arginineで消失する<sup>17)</sup>ことから、PHPによる昇圧機序はNOの合成あるいは放出の阻害である可能性が示唆される。これらのことからCOによる血圧低下を、PHPの作用観点から考えると、COによる血圧低下に交感神経系やprostaglandinsが関与している可能性は低く、NOの関与の可能性が大きいと考えられる。

本研究は、CO中毒におけるPHP投与はO<sub>2</sub>供給のみならず、血圧低下回復にも効果があることから、1) CO中毒時に発現する血圧低下にNOが関与しているか、2)もし、NOが関与するとしたら、CO中毒による血圧低下をPHPおよびL-NAMEが抑制するか、3) AChによる摘出血管弛緩のPHPによる抑制がNOの関与によるものか、を検討すること目的とした。

## 2. 実験方法

### 2.1. 使用動物

雄性日本白色種ウサギ（2.2～3.0kg、三協ラボサービス）を一群3～13羽用いた。ウサギは個別ケージ内で7日間の予備飼育（23±2°C, 55±5%, 8:00a.m.～8:00p.m.の12時間明サイクル）後、健常なものを実験に供した。この間、飼料（ORC4、オリエンタル酵母工業）は1日当たり150g/匹を与え、水（水道水）は自由摂取とした。

### 2.2. CO毒性ガス吸入による血圧および血漿中NO濃度の変化

#### 2.2.1. 標本作成

ウサギをurethane（1.0g/kg, i.p.）麻酔下に背位固定し、気管切開して、気管カニューレを挿入後に、人工呼吸器（1回換気量15mL、1分間50回）に接続した。薬物投与用に右大腿静脈にカニューレを挿入した。血圧測定用に右大腿動脈にカニューレを挿入し、圧トランスデューサーを介して血圧をポリグラフ上に記録した。採血用に左大腿動脈にカニューレを挿入した。

#### 2.2.2. 薬物およびCO毒性ガス

PHP（1.2g/20mL/kg/30min）、L-NAME（0.03, 0.3, 1, 3, 10, 30mg/0.1mL/kg）は、右大腿静脈カニューレから投与した。PHPの投与はinfusion pumpによって行い、L-NAMEの投与は急速静注により行った。対照群には溶媒として用いた生理食塩液（生食）を投与した。CO毒性ガスは、火災時に発生するガスの一つの状態を想定した実験<sup>2)</sup>に従い、CO混合ガス（組成、O<sub>2</sub> 5.0%, CO<sub>2</sub> 16.0%, CO 1.8%, N<sub>2</sub> 77.2%；ウエキコ一ポレーション）を用いた。空気は大気（実験室内空気）を用いた。CO毒性ガスの吸入後の呼気は密閉系バックに回収し、実験終了後、実験用ドラフトを介して大気中に放散した。

#### 2.2.3. CO毒性ガス吸入に対するPHPおよびL-NAMEの影響

##### 2.2.3.1. 実験操作

###### 2.2.3.1.1. 血圧測定

標本作成を行ったウサギに、人工呼吸器から空気を供給した状態でPHPの30分間持続静注あるいはL-NAMEの急速静注を行った。PHP投与終了直後あるいはL-NAME投与30分後に、吸入ガスを空気からCO毒性ガスに切り替え、実験開始から死亡までの最高動脈血圧（MAP）の変化を記録した。

###### 2.2.3.1.2. 血漿中NO濃度測定

血漿中NO濃度はMiskoらの方法<sup>20)</sup>に従って亜硝酸イオン（NO<sub>2</sub><sup>-</sup>）と硝酸イオン（NO<sub>3</sub><sup>-</sup>）の非蛋白結合型である遊離総量として測定した。

血液は、①薬物投与直前、②PHPの30分間持続静注終了直後あるいはL-NAME（生食）の急速静注30分後、③CO毒性ガス吸入によるMAP上昇後の安定期、④安定期のMAPから10%低下した時点を起点する安定期MAP値から50%低下するまでの間、の4回（Fig. 6）について、各3mLをヘパリンフィルム入りの遠沈管に左大腿動脈より採取した。血液は2,000gで遠心分離し、得られた血漿を非蛋白結合型の遊離NOを測定することを目的に

除蛋白を目的とした微量用限界濾過器（ミリポア社製セントリフリー）を用い2,000gで限外濾過してNO<sub>2</sub><sup>-</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を含む濾液として血漿を得た。血漿は遊離NO濃度測定まで-80°Cで凍結保存した。

NOの測定は以下の方法で行った。解凍した血漿100μLに、nitrate reductase (*Aspergillus niger*由来、Sigma) 14mUおよびNADPH (Sigma) 40μMを含む20mM Tris buffer (pH7.6) 50μLを加え、20°Cで5分間インキュベートしてNO<sub>3</sub><sup>-</sup>をNO<sub>2</sub><sup>-</sup>に還元した。蒸留水50μLを加えて希釈し、2,3-diaminonaphthalene (DAN) 試薬 (DAN 0.05mg/mL 0.62M HCl) を10μL加え20°Cで10分間反応させた。2.8N NaOH 5μLを添加し反応を終了させ、溶液100μLを分取して蒸留水で4mLに希釈した。分光光度計 (RF-500、島津製作所) を用い、365nmの励起光を照射し放射される450nmの蛍光を測定した。

##### 2.2.3.2. 血圧への影響

###### 2.2.3.2.1. MAP実験-1：PHP、L-NAMEの単独作用およびCO毒性ガス吸入直後のMAP上昇への影響 (Fig. 1)

PHPあるいはL-NAME投与がMAPに与える単独の影響の評価として、投与後のMAP変化、およびCO毒性ガス吸入直後のMAPの上昇に対するPHPおよびL-NAMEの影響を検討した。

###### 2.2.3.2.2. MAP実験-2：PHP、L-NAME投与から、CO毒性ガス吸入によりMAP 20mmHg低下までの時間 (Fig. 1)

CO毒性ガス吸入開始からMAPが20mmHgに達するまでの時間、および、CO毒性ガス吸入開始後、MAPが一旦上昇し最高値に到達した時点から20mmHgに低下するまでの時間に対するPHPおよびL-NAMEの影響を検討した。

###### 2.2.3.2.3. MAP実験-3：CO毒性ガス吸入からMAP低下開始までの時間 (Fig. 6)

CO毒性ガスの吸入を開始すると、MAPが一旦上昇する。その後、若干の安定した期間の経過後にMAPの低下がみられる。そこで、MAP低下開始前の、MAPの変化幅が5mmHg以内で一分間以上継続した期間を安定期と定めた。CO毒性ガス吸入開始からMAP低下開始までの時間（安定期の終了までの時間）、および、CO毒性ガス吸入開始後のMAP最高値到達時点からMAP低下開始までの時間に対するPHPおよびL-NAMEの影響を検討した。

###### 2.2.3.2.4. MAP実験-4：CO毒性ガス吸入によるMAP低下に対する影響 (Fig. 6)

CO毒性ガス吸入後MAPが安定期の10%低下した時点を起点とし、50%あるいは80%低下するまでの時間およびその間の血圧低下速度に対するPHPおよびL-NAMEの影響を検討した。

##### 2.2.3.3. 血漿中のNO濃度への影響 (Fig. 6)

CO毒性ガス吸入時の血漿中 NO濃度の変化に対するPHP（1.2g/kg）およびL-NAME（10mg/kg）の影響を濃度絶対値と基礎濃度に対する変化率で検討した。さらに、安定期のMAPか

ら10%低下した時点を起点として50%低下する間のNO濃度上昇率に対するPHPおよびL-NAMEの影響を検討した。

### 2.3. Acetylcholine (ACh) 静注による血圧低下に対する PHPおよびL-NAMEの影響

#### 2.3.1. 標本作成

雄性日本白色種ウサギをurethane (1.0g/kg, i.p.) 麻酔下で背位固定し、気管切開して、気管カニューレを挿入後に、人工呼吸器に接続した。薬物投与用に右大腿静脈にカニューレを挿入し、右大腿動脈にカニューレを挿入し、圧トランスデューサーを介して血圧をポリグラフ上に記録した。

#### 2.3.2. 薬物

PHP(1.2g/20mL/kg/30min), L-NAME(1, 3, 10, 30mg/0.1mL/kg) およびACh (0.1, 0.3, 1, 3, 10 $\mu$ g/0.1mL/kg) は、右大腿静脈カニューレから投与した。対照群には溶媒の生食を投与した。

#### 2.3.3. 実験操作

原則として、CO毒性ガス吸入実験と同様に行った。即ち、標本作成を行ったウサギに、人工呼吸器から空気を供給した状態で生食20mL/kg/30minを投与した。その後、ACh 0.1, 0.3, 1, 3, 10 $\mu$ g/0.1mL/kgを投与し、MAP低下と低下が半分回復する時間 ( $T_{1/2}$ ) を測定した。続いて、PHP 1.2g/kg/20mL/30min およびL-NAME 1, 3, 10, 30mg/0.1mL/kg投与群についても、それぞれ別な動物を用いて、同様の手順で実験を行った。

### 2.4. AChによる摘出胸部大動脈および陰茎海綿体の弛緩反応へのPHP, L-NAMEの影響

#### 2.4.1. 標本作成

雄性日本白色種ウサギをurethane (1.0g/kg, i.p.) 麻酔し、胸部大動脈および陰茎を摘出した。胸部大動脈リング標本 (1 × 1.2 × 3 mm) および陰茎海綿体標本 (1 × 1.2 × 15mm) は37°Cに加温し混合ガス (O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%) を通気したKrebs-Henseleit液 (NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.6, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24.9, glucose 11mM, Na<sub>2</sub>CaEDTA 40 $\mu$ M) 中に30mNの負荷をかけて懸吊した。発生張力は等尺性トランスデューサーを介してポリグラフ上に記録した。

#### 2.4.2. 薬物

薬物は蒸留水を溶媒として調整し用いた。作用検討の薬物濃度はAChは10<sup>-11</sup>～10<sup>-3</sup>M, PHPは0.1, 0.3, 1, 3mg/mL, noradrenalineは1 $\mu$ M, L-NAMEは0.1 $\mu$ M, L-arginineは1 mMとして実験を行った。

#### 2.4.3. 実験のデザイン

胸部大動脈標本ではnoradrenaline (1 $\mu$ M) による収縮に対するACh弛緩反応へのPHP, L-NAMEの影響を検討した。さらに、ACh弛緩反応への、1) L-NAME(0.1 $\mu$ M) + PHP(0.3mg/

mL) の影響、2) PHP (1 mg/mL), L-NAME (1, 10 $\mu$ M) による影響とそれに及ぼすL-arginineの影響を検討した。陰茎海綿体標本ではPHPの単独作用を中心に検討した。

#### 2.5. 統計学的解析

実験結果はmean±S.E.M.で示した。有意差検定はDunnett'sの多重比較, Tukey's testによる一元配置分散分析および二元配置分散分析, Student's non-paired t-testおよびStudent's paired t-testにより行い, p<0.05を有意とした。

### 3. 結果

#### 3.1. CO毒性ガス吸入による血圧変化を指標としての評価

##### 3.1.1. PHP, L-NAMEの単独作用およびCO毒性ガス吸入直後のMAP上昇への影響 (MAP実験-1)

CO毒性ガス吸入時の典型的な血圧の変化を図示 (Fig. 1) し、図中にFig. 2～5に関係する各測定パラメータを示した。

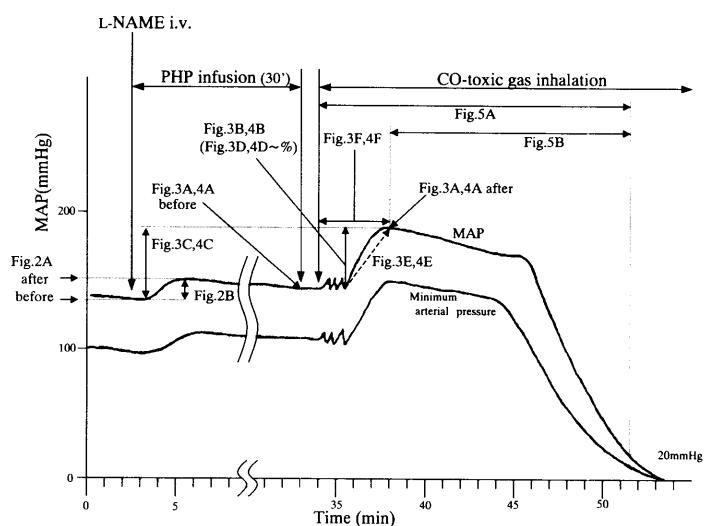


Fig. 1 Maximum arterial pressure (MAP) measurement points and their related figures (Fig.2～5) in the experiment-1・2.

- Fig. 2A after & before : Maximum arterial pressure (MAP) after and before drug treatment
- Fig. 2B : Absolute change of MAP after drug treatment
- Fig. 3A,4A before : MAP before CO-toxic gas inhalation
- Fig. 3A,4A after : MAP after CO-toxic gas inhalation
- Fig. 3B,4B : Absolute change of MAP after CO-toxic gas inhalation
- Fig. 3C,4C : Absolute change of MAP after CO-toxic gas inhalation from predrug base line
- Fig. 3D,4D : Percent change of MAP after CO-toxic gas inhalation
- Fig. 3E,4E : Hypertensive velocity after CO-toxic gas inhalation
- Fig. 3F,4F : Necessary time from the CO-toxic gas inhalation to the hypertensive summit
- Fig. 5A : Necessary time from the CO-toxic gas inhalation to MAP 20mmHg
- Fig. 5B : Necessary time from the hypertensive summit to MAP 20mmHg

単独作用：PHP (1.2g/20mL/kg/30min) およびL-NAME (0.03～30mg/kg) の投与は、いずれも有意にMAPを上昇させた (Fig. 2 A). L-NAMEは用量依存的なMAP上昇を示した (Fig. 2 B). PHP 1.2g/kgの投与はL-NAME 30mg/kg投与と同程度のMAP上昇を示した。

PHPのCO毒性ガス吸入によるMAP上昇への影響：CO毒性ガ

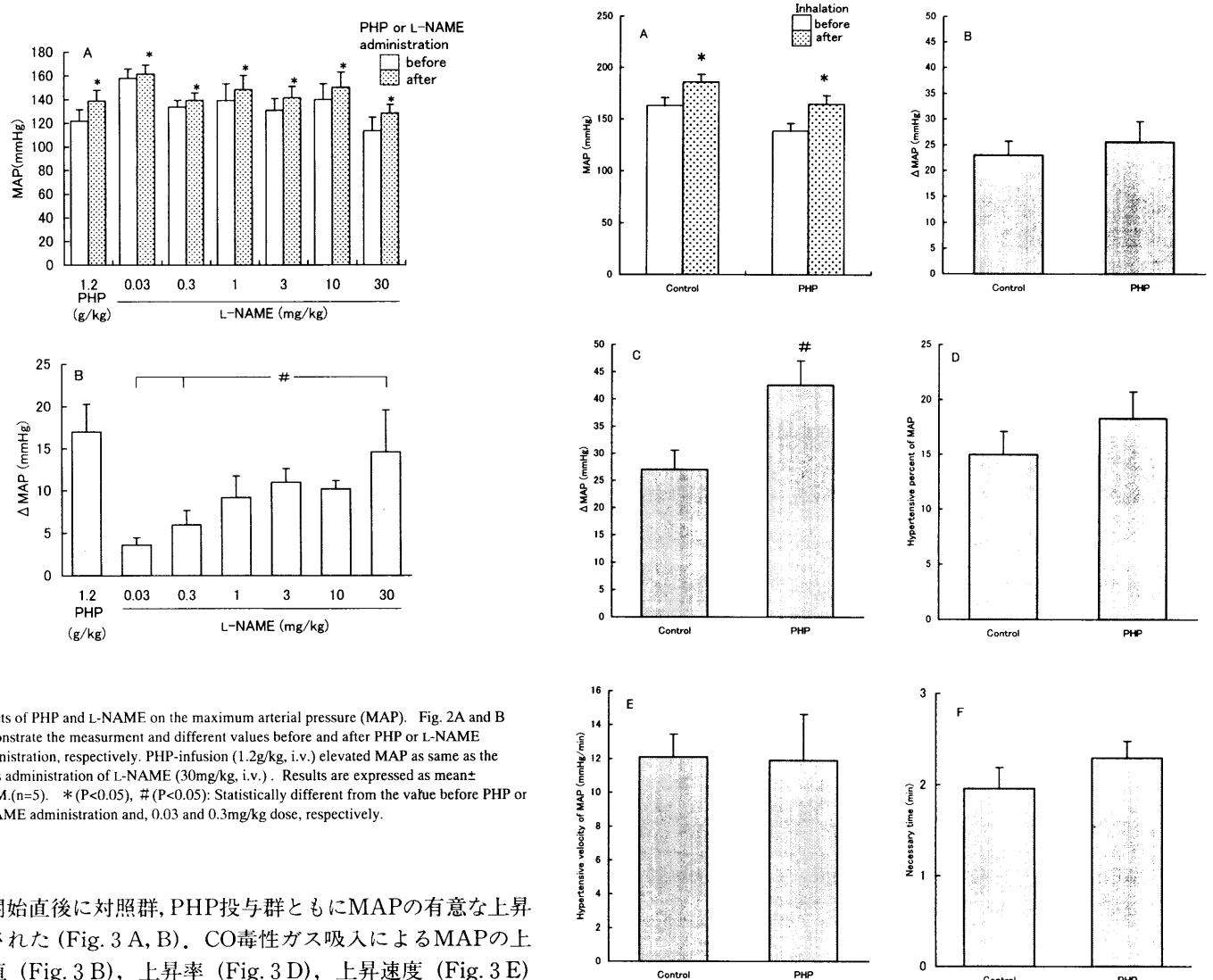


Fig. 2 Effects of PHP and L-NAME on the maximum arterial pressure (MAP). Fig. 2A and B demonstrate the measurement and different values before and after PHP or L-NAME administration, respectively. PHP-infusion (1.2g/kg, i.v.) elevated MAP as same as the bolus administration of L-NAME (30mg/kg, i.v.). Results are expressed as mean±S.E.M.(n=5). \* (P<0.05), # (P<0.05): Statistically different from the value before PHP or L-NAME administration and, 0.03 and 0.3mg/kg dose, respectively.

ス吸入開始直後に対照群、PHP投与群ともにMAPの有意な上昇が観察された(Fig. 3 A, B)。CO毒性ガス吸入によるMAPの上昇絶対値(Fig. 3 B), 上昇率(Fig. 3 D), 上昇速度(Fig. 3 E)およびガス吸入開始から血压が最高値に達するまでの時間(Fig. 3 F)の各パラメータに対して、PHPは有意な効果を示さなかった。また、PHP投与後のMAP絶対上昇値(Fig. 3 B)と上昇率(Fig. 3 D)は増加傾向がみられたものの有意でなかったが、PHP投与前のベースラインからのCO毒性ガス吸入による絶対上昇値(Fig. 3 C)に対しては、PHP投与群では有意な上昇が示された。

L-NAMEのCO毒性ガス吸入によるMAP上昇への影響：CO毒性ガス吸入開始直後の対照群、L-NAMEの各用量投与群ともにMAPの有意な上昇が観察された(Fig. 4 A,B)。CO毒性ガス吸入によるMAPの絶対上昇値(Fig. 4 B), ベースラインからの上昇絶対値(Fig. 4 C), 上昇率(Fig. 4 D)および上昇速度(Fig. 4 E)の各パラメータはL-NAMEの用量增加にともなって上昇する傾向があった：上昇速度を除く各パラメータはL-NAME 30mg/kg投与で対照群に対して有意な上昇を示した。ガス吸入開始からMAPが最高値に達するまでの時間(Fig. 4 F)は、L-NAME 0.03, 0.3mg/kgで延長し, 1~10mg/kgではこの延長がみられなかった。

Fig. 3 Effects of PHP (1.2g/kg/30min, i.v. infusion) on the maximum arterial pressure (MAP) changes induced by CO-toxic gas inhalation. (A : MAP before and after inhalation, B : Rised absolute values of MAP from the level after PHP administration, C : Rised absolute values of MAP from predrug base line after PHP administration, D : CO-toxic gas induced-hypertensive percent of MAP from the level after PHP administration, E : Hypertensive velocity of MAP from the rised level after PHP administration to the hypertensive summit after CO-toxic gas inhalation, F : Necessary times from the level after PHP administration to the hypertensive summit after CO-toxic gas inhalation). Refer A~F to those in the legend of Fig. 1. Results are expressed as mean±S.E.M.(n=5). \*,# (P<0.05): Statistically different from the value before CO-toxic gas inhalation and control, respectively.

### 3.1.2. MAPが20mmHgに低下するまでの時間へのPHP, L-NAMEの影響 (MAP実験-2)

CO毒性ガス吸入開始からMAPが20mmHgに低下するまでの時間(Fig. 5 A : PHP), およびガス吸入を開始後, 血圧が最高値に到達した時点からMAPが20mmHgに低下するまでの時間(Fig. 5 B : PHP)は, いずれもPHP投与群でわずかな延長があったが, 対照群との間に有意差は認めなかった。

L-NAME投与群(Fig. 5 A,B : L-NAME)においても, いずれの所要時間も対照群と比較して, わずかに延長する傾向があったが有意差は認めなかった。

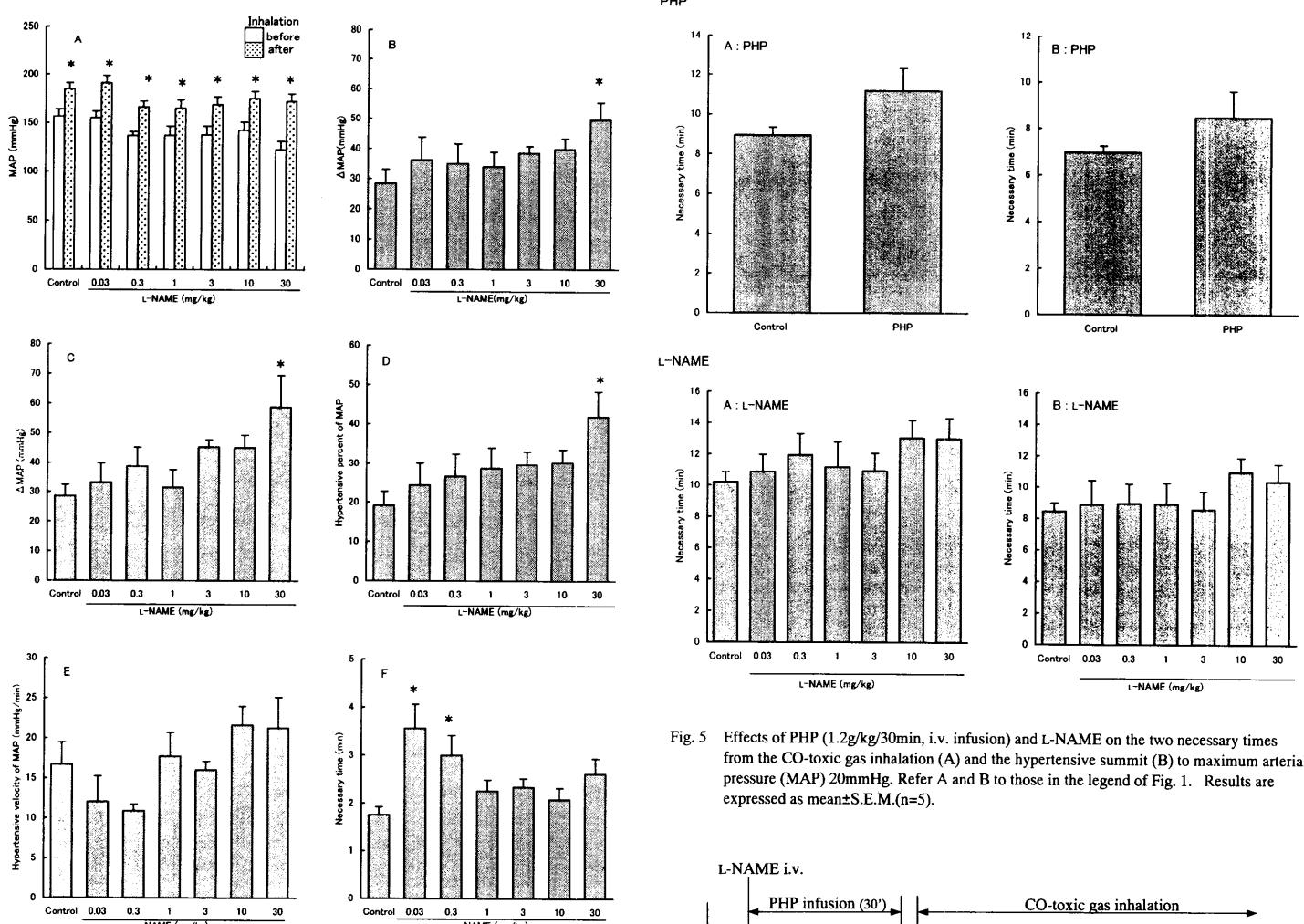


Fig. 4 Effects of L-NAME on the maximum arterial pressure (MAP) changes induced by CO toxic gas inhalation. (A : MAP before and after inhalation, B : Rised absolute values of MAP from the level after L-NAME administration, C : Rised absolute values of MAP from predrug base line after L-NAME administration, D : CO-toxic gas induced-hypertensive percent of MAP from the level after L-NAME administration to the hypertensive summit after CO-toxic gas inhalation, E : Hypertensive velocity of MAP from the level after L-NAME administration, F : Necessary times from the level after L-NAME administration to the hypertensive summit after CO-toxic gas inhalation). Refer A~F to those in the legend of Fig. 1. Results are expressed as mean±S.E.M.(n=5). \*(P<0.05): Statistically different from control.

### 3.1.3. MAP低下開始までの時間へのPHP, L-NAMEの影響 (MAP実験-3)

CO毒性ガス吸入時の典型的な血圧の変化を図示(Fig. 6)し、図中にFig. 7, 8に関係する各測定パラメータを示した。

CO毒性ガス吸入開始からMAP低下開始までの時間 (Fig. 7 A), ガス吸入を開始後、MAPが最高値に到達した時点からMAP低下開始までの時間 (Fig. 7 B)において、PHP投与と対照群の間に有意差は示されなかった。

さらに、L-NAME投与群についても、これらのパラメーター (Fig. 8 A, 8 B)に対照群との有意な差は認めなかった。

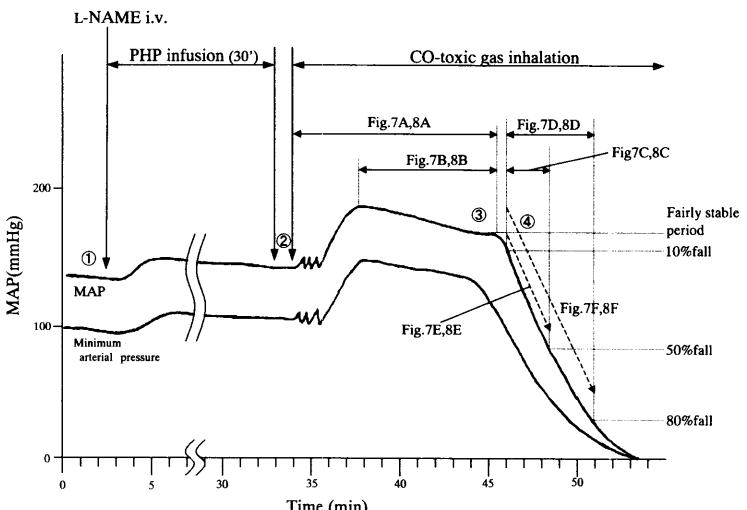


Fig. 6 Maximum arterial pressure(MAP) measurement points and their related figures (Fig.7,8) in the experiment-3\*4.

Fig. 7A,8A : Necessary time from the CO-toxic gas inhalation to the hypotensive onset  
 Fig. 7B,8B : Necessary time from the CO-toxic gas-induced hypertensive summit to the hypotensive onset  
 Fig. 7C,8C : Necessary time from the 10% to 50% fall in the hypotensive period  
 Fig. 7D,8D : Necessary time from the 10% to 80% fall in the hypotensive period  
 Fig. 7E,8E : Hypotensive velocity from the 10% to 50% fall in the hypotensive period  
 Fig. 7F,8F : Hypotensive velocity from the 10% to 80% fall in the hypotensive period

Blood samplings for plasma NO determinations were performed four times as indicated in the Fig.6 as follows:  
 ① Control (predrug level)  
 ② After drug treatment and just before CO-toxic gas inhalation  
 ③ At the end of CO-induced stable hypertensive period  
 ④ Falling period in the 10% to 50% fall in the hypotensive period

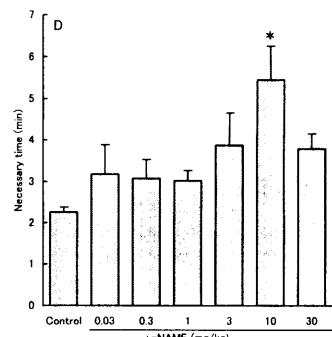
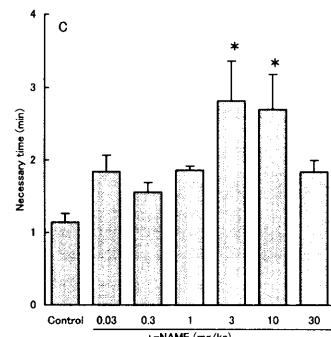
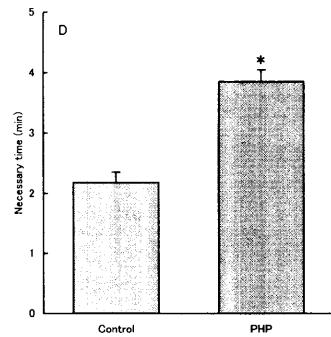
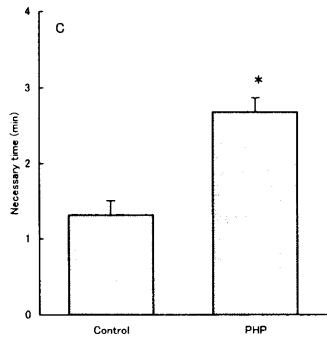
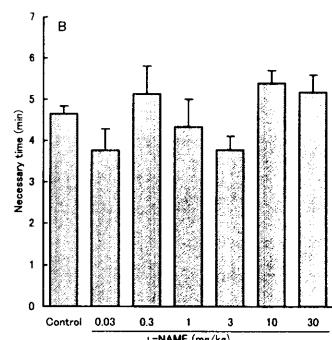
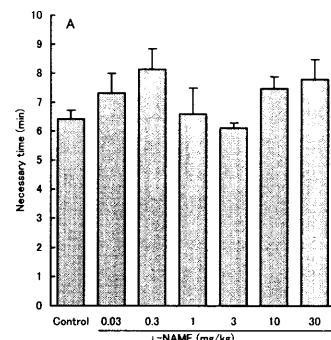
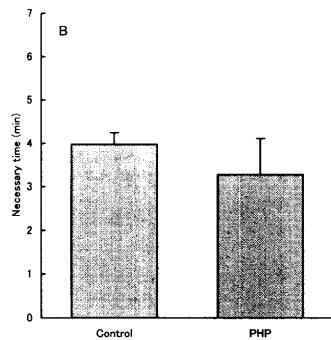
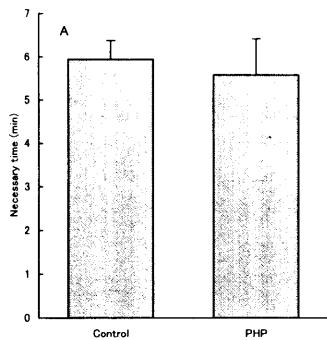


Fig. 7 Effects of PHP (1.2g/kg/30min, i.v. infusion) on the four necessary times (A~D) and hypotensive velocity (E&F) in the maximum arterial pressure (MAP) changes induced by CO-toxic gas inhalation. Refer A~F to those in the legend of Fig. 6. Results are expressed as mean±S.E.M.(n=5). \* (P<0.05): Statistically different from control.

Fig. 8 Effects of L-NAME on the four necessary times (A~D) and hypotensive velocity (E&F) in the maximum arterial pressure (MAP) changes induced by CO-toxic gas inhalation. Refer A~F to those in the legend of Fig. 6. Results are expressed as mean±S.E.M.(n=5). \* (P<0.05), \*\* (P<0.01): Statistically different from control.

### 3.1.4. MAP低下に対するPHPおよびL-NAMEの影響 (MAP実験-4)

#### 3.1.4.1. PHP

MAP低下所要時間：MAP低下開始後、安定期から10%低下した時点を起点として50%低下までに要する時間(Fig. 7 C)は、PHP投与群で $2.7 \pm 0.2$ minとなり、対照群の $1.3 \pm 0.2$ minに比較して有意に延長した。10%低下時点から80%低下までに要する時間(Fig. 7 D)も、PHP投与によって $3.9 \pm 0.2$ minとなり、対照群の $2.2 \pm 0.2$ minと比較して有意に延長した。

MAP低下速度：MAP低下開始後、安定期から10%低下した時点を起点として50%低下までのMAP低下速度(Fig. 7 E)は、PHP投与群で $-20.9 \pm 1.5$ mmHg/minとなり、対照群の $-46.1 \pm 6.3$ mmHg/minと比較して有意に低下した。10%低下時

点から80%低下までのMAP低下速度(Fig. 7 F)も、PHP投与によって $-26.1 \pm 3.1$ mmHg/minとなり、対照群の $-49.9 \pm 4.4$ mmHg/minと比較して有意に低下した。

#### 3.1.4.2. L-NAME

MAP低下所要時間：CO毒性ガス吸入によるMAP上昇の安定期から10%低下した時点を起点として50%低下までに要する時間(Fig. 8 C)は、3 mg/kg投与で $2.8 \pm 0.5$ min、10mg/kg投与で $2.7 \pm 0.5$ minとなり、対照群の $1.1 \pm 0.1$ minと比較して有意に延長した。10%低下時点から80%低下までに要する時間(Fig. 8 D)も、10mg/kg投与で $5.5 \pm 0.8$ minとなり、対照群の $2.3 \pm 0.1$ minと比較して有意に延長した。

MAP低下速度：MAP上昇の安定期から10%低下した時点を

起点として50%低下までのMAP低下速度(Fig. 8 E), および80%低下までのMAP低下速度(Fig. 8 F)は, L-NAMEの用量依存的に低下した。特に安定期の10%低下から50%低下までの間のMAP低下速度(Fig. 8 E)で, その傾向が顕著であり, L-NAME 1 mg/kg投与でのMAP低下速度は $-30.9 \pm 2.2$  mmHg/minとなり, 対照群の $-61.1 \pm 4.5$  mmHg/minと比較して有意に速度が低下しており, 1 mg/kg以上の投与でいずれも対照群と有意差がみられた。

### 3.2. CO毒性ガス吸入およびPHP, L-NAMEの血漿中NO濃度への影響

血圧の変化に対応した4回の採血点を図中(Fig. 6 ①~④)に示した。

対照群の血漿中NO濃度(Fig. 9)は, 薬物投与前(①)は $5.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$ を示し, CO毒性ガス吸入後のMAP上昇時(③)までは変化がないが, その後のMAP低下開始(④)で $6.0 \pm 0.7 \mu\text{M}$ となり, 有意に上昇した。薬物投与前(①)では対照群, PHPおよびL-NAMEいずれの群でも, 有意差は認められなかった。一方, 薬物投与群では, いずれも薬物の投与(②)によりNO濃度がPHPでは $5.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ から $4.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ へと, L-NAMEでは $4.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ から $3.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ へと有意に低下した。その濃度レベルはいずれの群もCO毒性ガス吸入によるMAP上昇時(③)まで維持された。その後のMAP低下(④)時に, PHP投与群は $5.1 \pm 0.4 \mu\text{M}$ から $5.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ へと上昇に転じた。

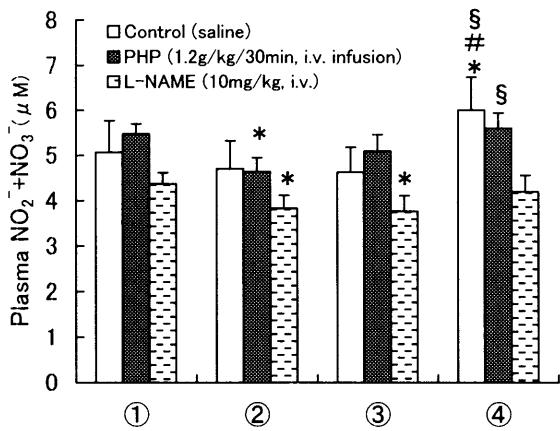


Fig. 9 Effects of PHP and L-NAME on the changes by CO-toxic gas inhalation of plasma free NO (nitrite+nitrate) level. The encircled figures such as ①, ②, ③ and ④ are corresponding to those in the legend of Fig. 6. Results are expressed as mean±S.E.M.(n=6). \* (① vs ② or ① vs ③ or ① vs ④, P<0.05), # (② vs ④, P<0.05), § (③ vs ④, P<0.05).

薬物投与前のNO濃度と比較すると(Fig.10), CO毒性ガス吸入によるMAP低下期(④)のNO濃度は, 対照群では $21.5 \pm 4.8\%$ 上昇したが, 薬物投与群では, PHP投与で $3.4 \pm 5.9\%$ の上昇, L-NAME投与では $4.5 \pm 4.3\%$ の低下と, 薬物投与前と同程度であり, 対照群と薬物投与群の間には有意差が認められた。

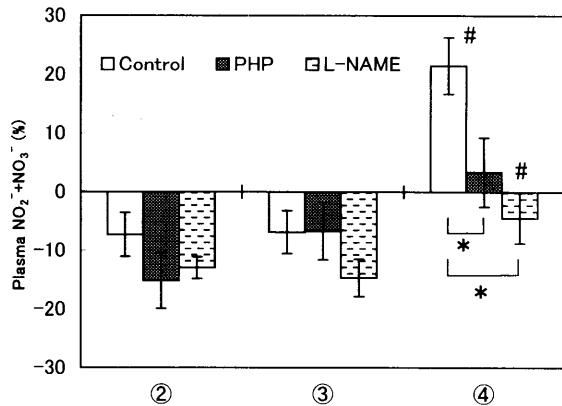


Fig. 10 Effects of PHP and L-NAME on the percent changes of plasma free NO (nitrite+nitrate) level after CO-toxic gas inhalation. The encircled figures such as ②, ③ and ④ are corresponding to those in the legend of Fig. 6. Results at ②, ③ and ④ are expressed as mean±S.E.M.(n=6) of percent changes based on predrug level (control, ①). \* (P<0.05): Statistically different from control, # (③ vs ④, P<0.05).

MAP低下期(④)ではCO毒性ガス吸入により, 対照群, 薬物投与群のいずれも血漿中NO濃度はMAP安定期(③)よりも上昇した(Fig.11)。MAP安定期からのNO濃度の増加率は, 対照群で $30.4 \pm 1.9\%$ , PHP投与で $11.5 \pm 4.5\%$ , L-NAME投与では $11.9 \pm 4.2\%$ の上昇であり, この期間のNO濃度の上昇は, PHPおよびL-NAMEで有意に抑制された。

### 3.3. AChによる血圧低下に対するPHPおよびL-NAMEの影響

ACh(0.1~10 μg/kg)による用量依存性のMAP低下に関し, PHP投与は絶対低下値(Fig.12A), 低下率(Fig.12B)のいずれにも有意な影響を与えるなかった。しかし,  $T_{1/2}$ (Fig.12C)は, PHP投与によって有意に短縮された。

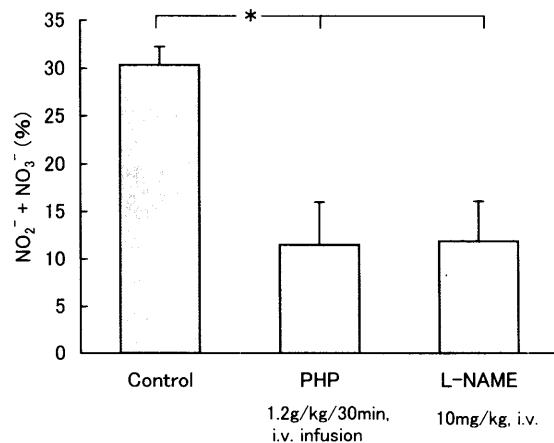
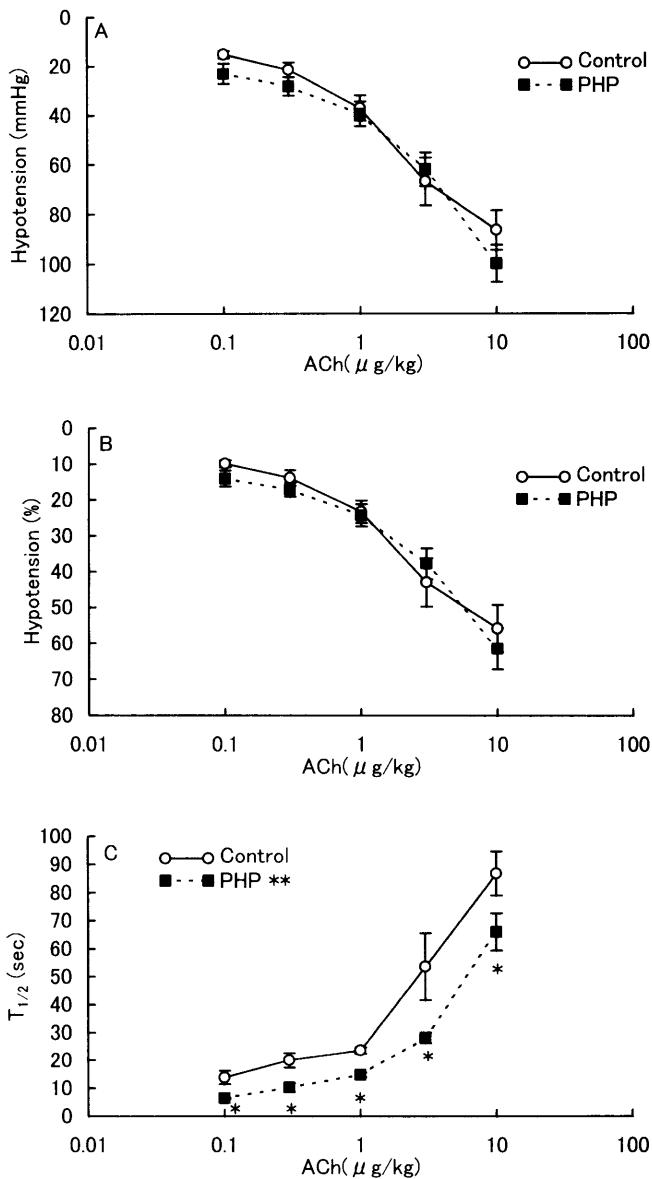
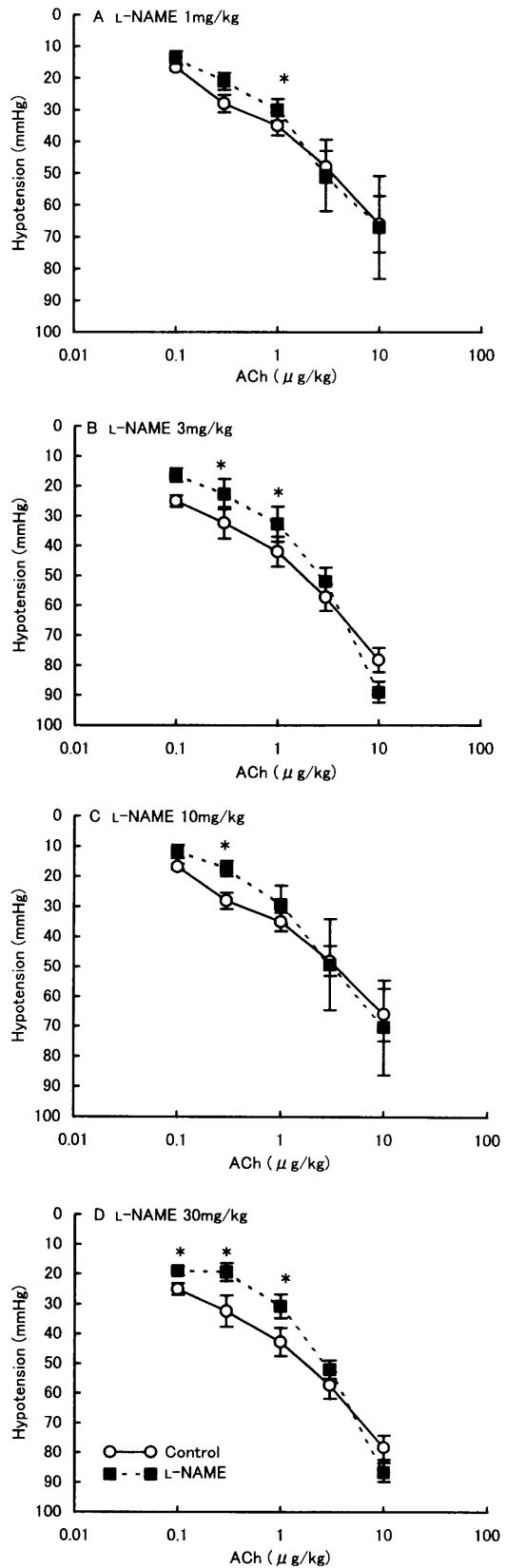


Fig. 11 Suppressive effects of PHP and L-NAME on the increase by CO-toxic gas inhalation of plasma free NO (nitrite+nitrate) level at the falling period (④). Results are expressed as mean±S.E.M.(n=6) of percent changes based on the levels at the end (③) of CO-induced hypertensive period. Refer ③ and ④ to those in the legend of Fig. 6. \* (P<0.05): Statistically different from control.



一方、L-NAME投与では、ACh(0.1~10 $\mu$ g/kg)によるMAP低下に関し、絶対低下値 (Fig.13)、低下率 (Fig.14) のいずれもAChの0.1, 0.3, 1 $\mu$ g/kgにおける低下反応のいずれかにおいて、これらを有意に抑制したがL-NAMEの投与量(1, 3, 10, 30mg/kg)による用量依存性はみられなかった。 $T_{1/2}$  (Fig.15) は、L-NAMEのいずれの投与量においても短縮され、L-NAME 3mg/kg以上で有意差が認められた。MAP絶対低下値、低下率に影響をほとんど与えなかったACh 1, 3, 10 $\mu$ g/kgのL-NAMEによる $T_{1/2}$ の短縮効果 (Fig.16) は、AChの用量が増加するほど強く発現した。



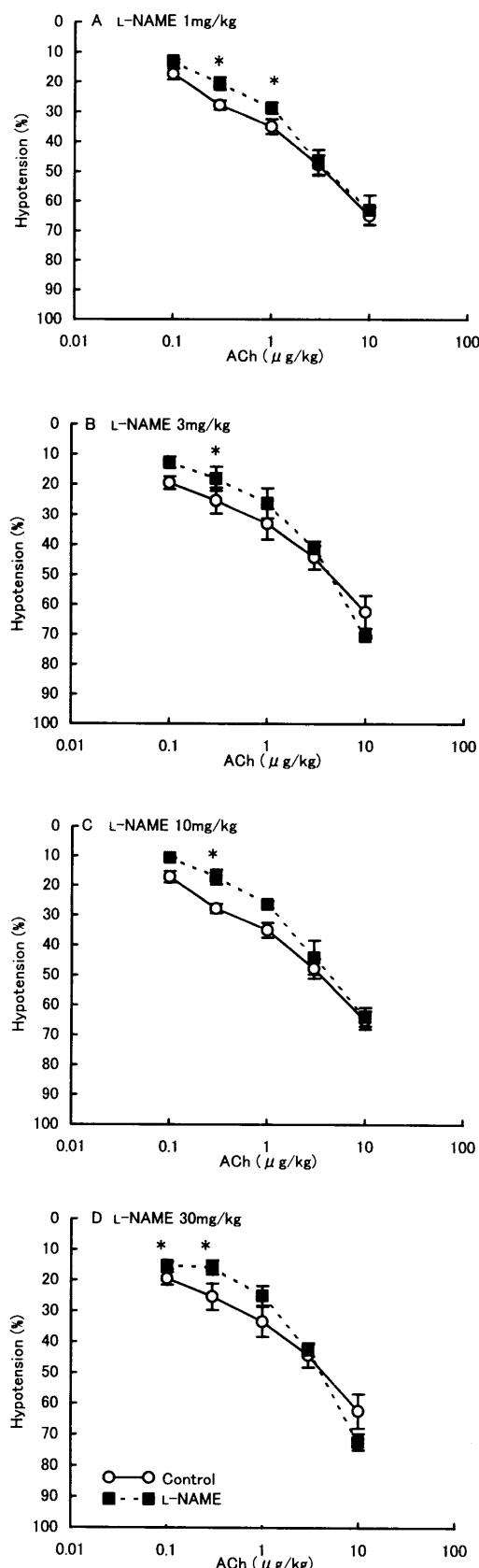


Fig. 14 Effects of L-NAME on ACh-induced hypotension. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=4). \*P<0.05: Statistically different from control.

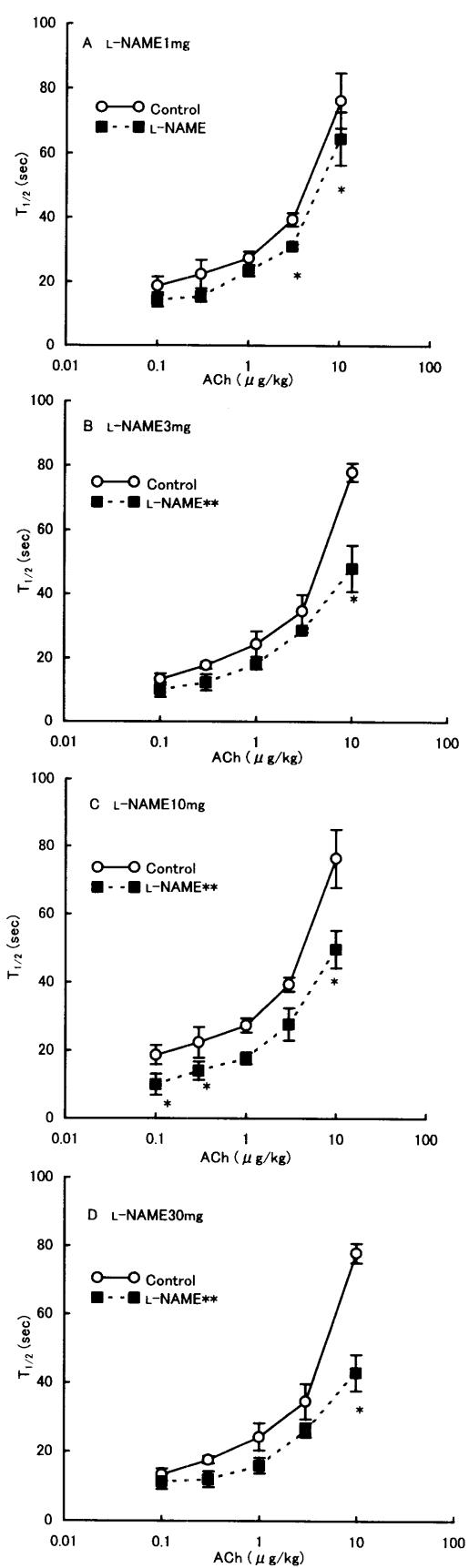


Fig. 15 Effects of L-NAME on the half-recovery time ( $T_{1/2}$ ) of the ACh-induced hypotension. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=4). \*P<0.05, \*\*P<0.01: Statistically different from control.

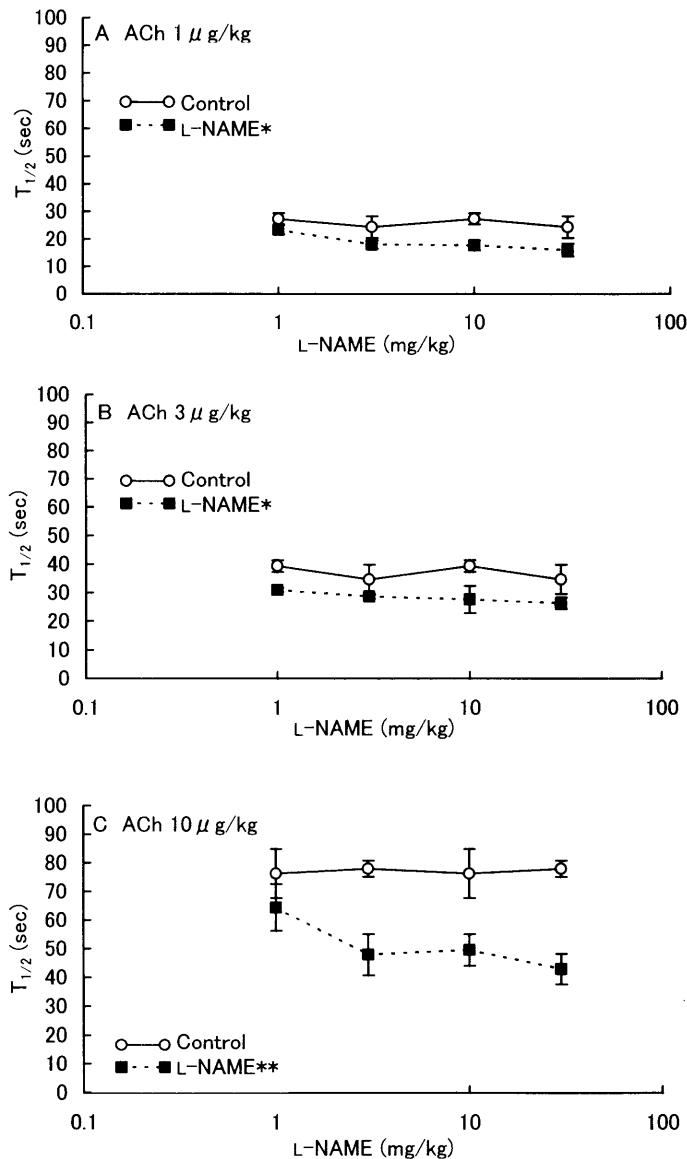


Fig. 16 Effects of L-NAME on the half-recovery time ( $T_{1/2}$ ) in the ACh-induced hypotension. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ : Statistically different from control.

### 3.4. AChによる胸部大動脈および陰茎海綿体の弛緩反応に対するPHPおよびL-NAMEの影響

胸部大動脈：AChは濃度依存的弛緩を示し、 $10^{-6}$ Mで、ほぼ完全な弛緩であった。PHPはこれらの弛緩を用量依存的に抑制した(Fig.17A)。L-NAME 0.1μM (Fig.17B)はAChによる弛緩に影響を与えないが、弱い抑制を示していたPHP 0.3mg/mLを存在させることでAChによる弛緩をさらに強く有意かつ相乗的に抑制した。L-Arginine 1mM存在下では、PHP 1mg/mLによる弛緩の抑制 (Fig.17C)は影響を受けなかったが、L-NAME 10μMによるACh弛緩の抑制 (Fig.17D)は有意に回復した。

陰茎海綿体：AChは濃度依存的弛緩を示し、 $10^{-5}$ Mで、ほぼ完全な弛緩であった。PHPはこれらの弛緩を用量依存的に抑制し

た(Fig.18A)。一方、AChによる弛緩に影響を与えないL-NAME 0.1μM (Fig.18B)は、ほとんど抑制作用を示さないPHP 0.3mg/mLの存在下でAChによる弛緩を有意、かつ相乗的に抑制した。

## 4. 考察

### 4.1. 血圧を指標としての評価

#### 4.1.1. PHP, L-NAME単独による血圧上昇

L-NAMEは用量依存的な血圧上昇を示した。このL-NAMEによる昇圧はL-NAMEがL-arginineのanalogであり、NOSの基質であるL-arginineと競合的拮抗し、NO合成阻害による間接的な血管収縮に起因すると考えられる。本実験で、L-NAME 10mg/kg投与後に血漿NO濃度が $4.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ から $3.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ へ有意に低下した結果はこれを支持する。

一方、CO毒性ガス吸入への救命効果が認められた用量および投与条件 (1.2g/20mL/kg/30min) に従った<sup>14</sup>PHPは、本実験では、有意に血圧を上昇させた。PHP投与による昇圧時に、血漿中のNO濃度が $5.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ から $4.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ へと有意に低下しており、NOの関与が示唆される。このNO濃度の低下は、hemeと親和性が高いNOがPHPのheme構造部位に捕捉される<sup>21,22</sup>ことで説明されうる。加えて、Kidaたちの報告<sup>17</sup>、「PHPによる昇圧はL-arginineによって消失する」は、これを支持する。

本報告において、血漿中NO濃度測定により、PHPおよびL-NAMEによる昇圧にNOが関与していることが示唆される。

#### 4.1.2. CO毒性ガス吸入による血圧上昇へのPHP, L-NAMEの影響

CO毒性ガスの吸入により、対照群、PHPおよびL-NAME投与のいずれの群でも血圧は上昇した。この昇圧には、血液中のCO<sub>2</sub>増加、O<sub>2</sub>低下による頸動脈小体および大動脈小体などの化学受容器興奮による血管収縮などの影響が関与していると考えられる。この昇圧に対してPHPは、血圧の上昇絶対値、上昇率、血圧最高値への到達時間に若干の影響を与え、昇圧促進の傾向を示した。しかし、血圧上昇時の血漿中NO濃度には有意な影響を与えたなかった。

L-NAMEはPHPと同様に上昇絶対値、上昇率および上昇速度で用量依存的に昇圧を促進する傾向が示され、上昇速度を除いて、いずれも30mg/kg投与で対照群に対して有意な促進が認められた。一方、血圧最高値への到達時間は0.03および0.3mg/kgの低用量でのみ有意に延長した。これは、L-NAME 0.03~10mg/kg投与での血圧の上昇値がほぼ一定であり、上昇速度は用量依存的に増加しているために低用量のL-NAMEでは、血圧最高値への到達時間が延長したと考えられる。血漿NO濃度はPHP、L-NAMEとともにそれらの単独作用による血圧上昇時には有意に抑制されており、L-NAMEではCO毒性ガスによる血圧上昇時まで、その低下した濃度が維持された。このことからPHPおよびL-NAMEによる昇圧は、PHPではNOを捕捉することで、L-NAMEはNOSの阻害により、いずれも血漿中のNO濃度を低下させることにより生じることが示唆される。一方、対照およびPHP、L-NAMEともに、CO毒性ガスの吸入により、初期に昇圧を示したが、血漿中NOの低下はPHPではみられなくなり、L-NAMEで

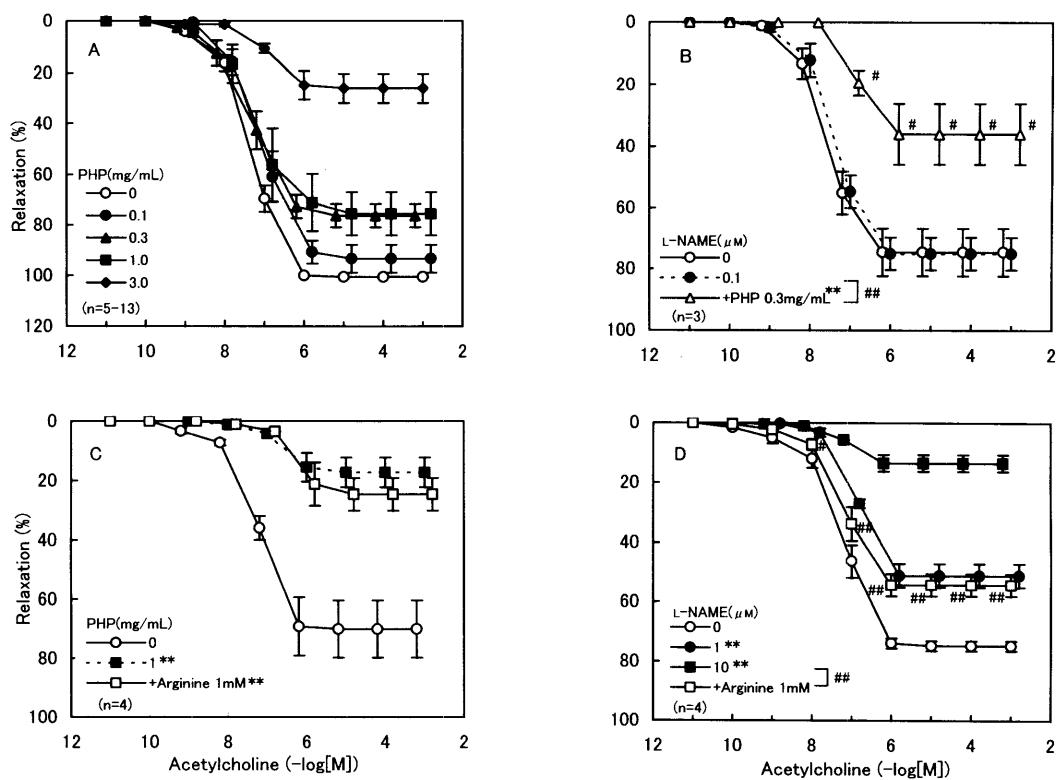


Fig. 17 Inhibitory effects of PHP and L-NAME on the ACh-induced relaxation of thoracic aorta. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. \*and #P<0.05, \*\* and ##P<0.01: Significantly different from control.

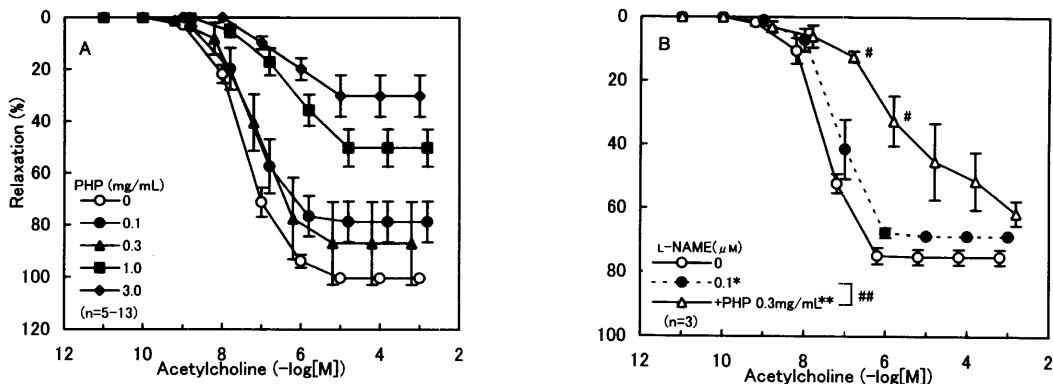


Fig. 18 Inhibitory effects of PHP and L-NAME on the ACh-induced relaxation of corpus cavernosum penis. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. \*and #P<0.05, \*\* and ##P<0.01: Significantly different from control.

は低下したまま変化がなかった。このことは、測定点がCO毒性ガスによる血圧低下開始直前であることより、PHPではNOの捕捉力がカバーしきれなくてNOの変化がみられ、L-NAMEではNO合成抑制により低下したままであることを示唆し、CO毒性ガス吸入による初期昇圧にはNOは係わりを持たないと考えられる。

#### 4.1.3. CO毒性ガス吸入による血圧の変化と血漿NO

血圧が20mmHgに低下するまでの時間：CO毒性ガス吸入を開始してから血圧が20mmHgまで低下する所要時間、およびCO毒性ガス吸入を開始後、血圧が最高値に到達した時点から血圧が20mmHgまで低下する所要時間は、いずれもPHPあるいはL-NAMEの投与により延長傾向にあったが、有意差はなかった(Fig.

5 A,B). これは、PHPあるいはL-NAMEの作用が、これらの計測期間の全体には及ばず、一部分の期間にのみ影響している可能性を示唆する。

血圧低下開始までの時間：CO毒性ガス吸入開始から血圧低下開始 (Fig. 7 A, 8 A) あるいはCO毒性ガス吸入開始後血圧が最高値に達してから血圧低下開始 (Fig. 7 B, 8 B) までの所要時間には、PHP投与あるいはL-NAME投与による延長は認められなかつた。さらに、CO毒性ガス吸入前と吸入後の血圧安定後期(血圧低下直前)の血漿中のNO濃度は対照、PHP、L-NAMEともに変化がほとんどみられなかつた。このことはCO毒性ガス吸入による昇圧期にはNOは関与せず、PHPによるNOの捕捉、あるいはL-NAMEによるNOSの阻害は、この期間には影響を示さず、その後の血圧下降開始以後の期間に影響している可能性を示す。

血圧の10%低下から50および80%低下までの時間および血圧低下速度：CO毒性ガス吸入による血圧低下において、最高血圧が定期血圧の10%低下時点から50%低下までの所要時間 (Fig. 7 C, 8 C), および80%低下までの所要時間 (Fig. 7 D, 8 D) のいずれもPHP、L-NAMEによって有意に延長した。さらに、定期血圧の10%低下時点から50%低下までの血圧低下速度 (Fig. 7 E, 8 E), および80%低下までの血圧低下速度 (Fig. 7 F, 8 F) は、いずれもPHPおよびL-NAME投与によって有意差をもって低下した。

これらのこととは、COによる血圧低下にNOが関わっていること、PHP、L-NAMEがCOによる血圧低下を抑制することを示す。このPHPによる血圧低下抑制は、PHPがNOを捕捉して不活性化し、COによる血圧低下時の血漿中NOの増加を抑制した (Fig. 10) ことにより生じたことが示唆される。

一方、L-NAMEでは、NO合成阻害によりNOが低下し (Fig. 10), COによる血圧低下を抑制することが示唆される。

後述するように、AChによる血圧の低下が、PHP、L-NAMEにより抑制されることから、PHP、L-NAMEがNOの捕捉、合成阻害に関与していることが本標本において確認されていることも、COによるNOとの関連を支持する。

以上の結果から、COによる血圧の低下にはNOが関与していることが示唆される。COにもguanylate cyclase (GC) を直接に活性化する作用<sup>23)</sup>が報告されているが、その作用はNOと比較して非常に弱い<sup>24)</sup>。したがって、COは主としてNOの増加を促進し、そのNOがGCを活性化し、間接的に血管平滑筋弛緩を促進し、血圧を低下させると考えられる。

#### 4.2. 血漿中のNO濃度の変化

PHPによる昇圧時には血漿中NO濃度が有意に低下 (Fig. 9 : ①対②) し、同様にL-NAMEによるMAPの上昇時にも血漿中NO濃度が有意に低下 (Fig. 9 : ①対②) したことから、これらの薬物の昇圧作用に対する血漿中NOの関与の可能性が示された。PHPではNOの捕捉、L-NAMEではNOの合成阻害によりNO低下が生じ、これが昇圧をもたらしたことが示唆される。

対照、PHPおよびL-NAMEのいずれも、CO毒性ガスの吸入による昇圧時には血漿中NO濃度の変化は生じにくかった (Fig. 9 : ②対③, Fig. 10 : ②対③) ことから、このCOによる昇圧には

NOは関与していないと考えられる。

対照、PHP、L-NAMEともに昇圧定期後の中压低下時には血漿中NO濃度が上昇した。PHPの血漿中NO濃度上昇 (Fig. 9 : ③対④) は、PHPの捕捉能力以上のNOが生じたためと考えられる。上昇の大きさは、PHPあるいはL-NAMEではそれらの投与前程度までの値に留まつたのに対して、対照は薬物投与前のNO濃度を $21.5 \pm 4.8\%$ と大きく上回つた (Fig. 10 : ④)。さらに、定期後期に対する下降期の血漿中NOの増加率も、対照では $30.4 \pm 1.9\%$ と大きく増加しているのに対してPHP、L-NAMEでは増加率が有意に抑制された (Fig. 11)。これらのことから、CO毒性ガス吸入による血圧低下には一部NOが関与していることが示唆される。

#### 4.3. ACh投与による血圧低下抑制からのPHPおよびL-NAMEの作用点の確認

AChによる血圧の低下に対して、PHPは有意な効果を示さなかつたが、血圧回復のT<sub>1/2</sub>を有意に短縮した。これはbradykinin (BK) による血管の弛緩に対するHbの効果<sup>25)</sup>と同様であった。BKによる血管弛緩反応はendothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) とendothelium-derived relaxing factor (EDRF)=NOによると考えられ、EDHFが潜時の短い弛緩を、EDRFが比較的潜時の長い弛緩に関与していると考えられている<sup>26)</sup>。したがって、弛緩の大きさは主にEDHFの、T<sub>1/2</sub>はEDRFの弛緩を反映すると考えられ、PHPがAChによる最大血圧低下値の大きさに変化を与えず、血圧回復のT<sub>1/2</sub>を有意に短縮したことは、PHPがNOを捕捉して不活性化することを支持すると考えられる。

L-NAMEはいずれの投与量でもACh 0.1~1μg/kgの範囲でAChのいくつかの投与による血圧低下を有意であるが弱く抑制し、血圧回復T<sub>1/2</sub>をPHP同様に短縮した。AChによる血圧低下をL-NAMEがほとんど抑制しなかつたことは、前述のごとく、弛緩の大きさには主にEDHFが影響する<sup>26)</sup>ことから説明される。これら、PHP、L-NAMEのAChへの作用により本実験系でのPHP、L-NAMEの作用点としてのNO捕捉、NO合成阻害効果を間接的に確認した。

#### 4.4. 胸部大動脈および陰茎海綿体におけるAChの弛緩反応に対するPHPおよびL-NAMEの抑制効果

胸部大動脈および陰茎海綿体のいずれも、AChによる弛緩は、PHPによって用量依存的に抑制された。さらに、AChによる弛緩に対してほとんど抑制効果を示さない低濃度のL-NAME (0.1 μM) にPHP (0.3mg/mL) を共存させるとPHPの抑制効果が相加的でなく、相乗的に増強した (Fig. 17B, Fig. 18B) ことから、AChのNOを介した血管弛緩に対してPHPとL-NAMEは、それぞれ、NO捕捉とNOS阻害という作用点が異なることを支持する。このことは、さらにPHPのACh弛緩反応の抑制はL-arginineにより影響を受けず、L-NAMEのそれは抑制されたことからも間接的に裏付けられた。これについては、PHPによる昇圧がNOS阻害薬であるN<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) で抑制され、その抑制がL-arginineにより反転するKidaたち<sup>17)</sup>の結果と、

一見矛盾するようにみえる。しかし、Kidaたちの実験は、投与したL-arginineに対するPHP量が、本実験の1/10程度であるため、NO捕捉力が低く本実験では生じなかったL-arginineによる拮抗は、Kidaたちの実験ではL-NMMEによるNOS阻害に拮抗したと考えられる。

#### 4.5. 生体内代謝によるNOの不活性化とPHP, L-NAME

NOの生体内での代謝経路にはいくつある<sup>27)</sup>。NOは非常に反応性に富んでおり、水およびO<sub>2</sub>の存在で容易に反応してNO<sub>2</sub><sup>-</sup>やNO<sub>3</sub><sup>-</sup>となる。また、NOのHbとの結合力はCOの約1500倍<sup>28)</sup>と非常に強く、血液中のNOは直ちにHbのheme部位と結合して失活する。生成されたnitrosylhemoglobin (NOHb)は、さらに酸化を受けてmethemoglobin (metHb)とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>になる。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>は尿中に排泄され、metHbはmetHb reductaseによって再度Hbとなる。他に、NOは superoxide と反応して peroxy nitrite (ONOO<sup>-</sup>)を生じ、さらにこれが分解して hydroxyl radical と NO<sub>2</sub>となる。これらは再び反応してNO<sub>3</sub><sup>-</sup>とH<sup>+</sup>になる。その他にNOはSH基を有したglutathione, cysteine, albuminなどと反応してS-nitrosothiolを形成し、失活する。

本実験では、CO毒性ガス吸入による血圧低下に対して、NOとの親和性が高いheme構造を分子中に有するPHPを投与し、血圧低下抑制作用がみられている。したがって、PHPによる血圧低下抑制作用にはNOとhemeの結合反応が関与していることが考えられる。これは、Hb修飾体投与による血圧上昇の原因がNOの捕捉によるとする説<sup>22)</sup>からも支持される。

一方、L-NAMEの抗NO効果は、NOS阻害によるものであり、PHPとL-NAMEの作用機序は異なる。これはACh投与による血圧低下および血管弛緩反応に対するPHPおよびL-NAMEの抑制効果の結果と一致している。

#### 4.6. CO中毒時に発生する血圧低下機構の推定

COは同じ低分子monoxideであるNOの1500分の1と低いが、O<sub>2</sub>に対しては200倍のheme結合力を持ち、類似の構造、性質を有している。NOのみならずCOも生体内での情報伝達物質としての機能を持ち、GCを活性化して細胞内のcGMPを増加させることが報告されている<sup>23,30,31)</sup>が、COが重要な働きをするのは脳、肝臓、脾臓での循環器系に限られると考えられている<sup>31)</sup>。

内因性のCOは heme oxygenaseによってhemeが代謝される結果、biliverdin IX- $\alpha$ や鉄とともに生成される<sup>32)</sup>。COはNO同様、GCを活性化し<sup>23,30,31)</sup>、細胞内のcGMPを増加させる。この効果は、superoxide dismutaseによって増強される<sup>33)</sup>。しかし、活性化の強さには大きな差があり、COによるGCの活性化はNOの約1/50程度である<sup>24)</sup>。

*in vitro*で行われたThomらの報告<sup>34)</sup>では、COの添加によって血液中のNOが増加し、L-NAMEの投与によりNO合成が抑制され、NO量は減少している。このCOによるNO増加のL-NAMEによる抑制はL-arginine投与によって消失している。このことは、CO中毒による血圧の低下にNOが関与していることを支持する。さらに、CO 1000ppmではNOSの活性は変化しないままNOの増加がみられているが、COの濃度が3000ppmに達するとL-citrulline

の産生が減少しており、NOS活性が抑制される一方で、NOは対照よりも有意に増加している。この高濃度のCOによるNOSの抑制は、NOSのheme構造部位にCOが結合することによる<sup>35,36)</sup>と考えられる。また、1) 低濃度のCOではNOS活性が変化しないままNOが増加すること、2) 高濃度のCOではNOS活性が抑制されながらもNOが増加していることを考えあわせると、COによる血圧の低下は、hemeとの高い親和性を有するCOが、ミトコンドリアや血小板の細胞質に存在しているheme-containing proteinのheme部に結合していたNOと置き換わり、NOを遊離させるために生じることが考えられる<sup>34)</sup>。

以上のことから、CO中毒における血圧低下の機序は、次のように推定される (Fig.19) : 1) NOは血管内皮細胞などでNOSによりL-arginineから合成される、2) 合成されたNOはミトコンドリアや血小板の細胞質に存在しているheme-containing proteinと結合する、3) 過剰のCOが供給されるとheme-containing proteinと結合していたNOの一部とCOが置き換わりNOが遊離する、4) 遊離したNOはCOよりも約50倍の活性をもってGCを活性化する、5) cGMPの産生が増加して血管平滑筋の弛緩を生じ、血圧が低下する。

NOのHb結合能力はCOの約1500倍、O<sub>2</sub>の30万倍であり<sup>28)</sup>、さらにNOの平滑筋弛緩能力はCOの150倍とされている<sup>37)</sup>。したがって、COによる血圧低下に対するPHPの抑制作用は、修飾されたHbが、遊離したNOを捕捉し不活性化することで発現すると考えられる。

また、L-NAMEの前投与によるCO中毒時の血圧低下抑制は、CO吸入開始前にミトコンドリアや血小板のheme-containing proteinと結合するNOの合成を阻害することによると考えられる。このように、PHPとL-NAMEはCOによる血圧低下に対する抑制機序が異なるので相乗効果が期待できる。しかし、L-NAMEによる血圧低下抑制作用が、CO毒性ガス吸入開始前にミトコンドリアや血小板のheme-containing proteinと結合するNOの合成阻害であるとすれば、COによる血圧低下後の投与が有効であるか否かは、今後の検討を要するものと考えられるが否定的であろう。加えて、PHPがCO中毒時における簡便で有用な救命効果はCOとの結合力の強さ、NOの捕捉能力などを中心にさらなる検討を期待する。

#### 5. 結論

- 1) CO毒性ガスの吸入により血圧は、初期の上昇、次いで安定期、低下期と推移した。
- 2) PHPおよびL-NAMEのいずれも単独で昇圧効果を示し、CO中毒による血圧低下速度を有意に抑制した。この効果はL-NAMEで用量依存的であった。
- 3) PHPおよびL-NAMEはいずれもCO中毒による血圧低下時において、COによって誘導された血漿中遊離NOの増加を抑制した。
- 4) 胸部大動脈および陰茎海綿体の摘出血管標本で、AChによる弛緩はPHPおよびL-NAMEでいずれも抑制された。L-NAMEによる弛緩抑制はL-arginineで減弱したが、PHPによるそれにはL-arginineは影響しなかった。

5) 以上の結果から、CO毒性ガス吸入に誘導される血圧低下に、NOの発生が部分的に関与することが示唆される。さらに、PHPとL-NAMEは、それぞれNOの捕捉とNOSの抑制効果によってCOにより誘導される血圧低下を抑制するものと考えられる。

えられる。PHPはCO毒性ガス吸入による中毒時の循環抑制に対し、その効果が期待されるが、今後の更なる検討を待ちたい。

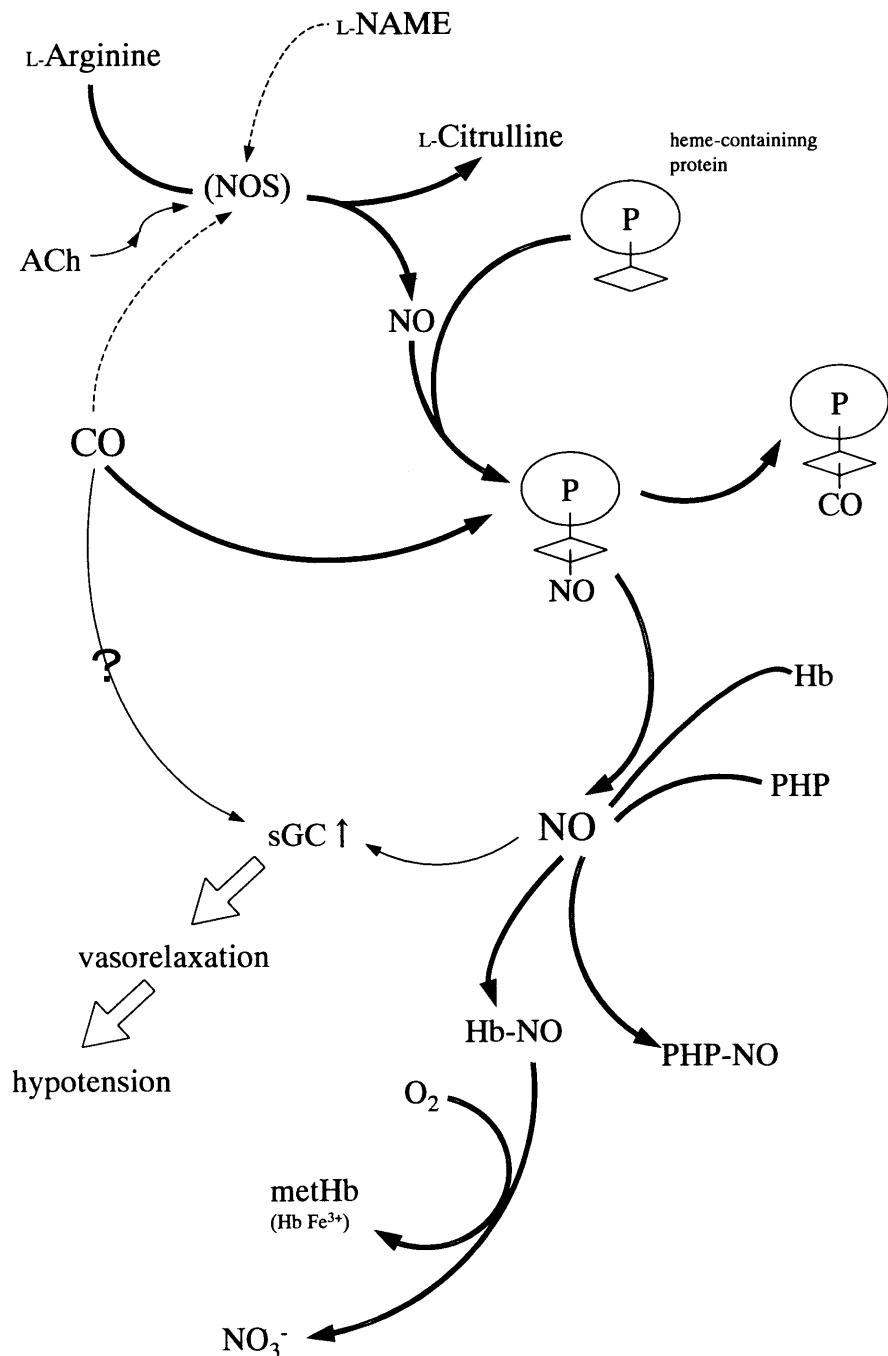


Fig. 19 Hypothesized mechanism of the preventing effects of PHP and L-NAME against the CO-induced hypotension via respective NO capturing and NO synthase inhibitory actions.

Solid line (→): activation  
Dotted line (↔): inhibition  
Straight line (→): conversion

## 謝辞

本研究および本論文に終始ご指導頂きました東邦大学医学部薬理学教室 内山利満教授に心から感謝いたします。

PHPの提供を頂きました味の素株式会社に感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Lee-Chiong Jr TL. Smoke inhalation injury. Postgrad Med 1999; 105:55-62.
2. 服藤恵三, 内山利満. 酸欠死に対する二酸化炭素の相乗効果. 日法医誌1989; 43: 424-429.
3. 服藤恵三. 酸欠環境下での一酸化炭素中毒死に対する二酸化炭素の相乗効果. 日法医誌1992; 46: 198-211.
4. Tewarson A. Ventilation effects on combustion products. Toxicology 1996; 115: 145-156.
5. 八木博司, 三谷昌光, 楠田憲治. 一酸化炭素中毒. 最新医学 1994; 49: 1226-1233.
6. 東岡宏明, 篠崎正博. COとCO<sub>2</sub>. 救急医学1996; 20: 1666-1667.
7. 高橋英世, 小林繁夫, 榊原欣作. 一酸化炭素中毒. 最新医学 1986; 41: 241-245.
8. Baskin SI, Nealey EW, Lempka JC. The effects of EDRF/NO releasers or calcium ionophore A23187 on cyanide toxicity in mice. Toxicol Appl Pharmacol 1996; 139: 349-355.
9. Gunasekar PG, Borowitz JL, Isom GE. Cyanide-induced generation of oxidative species: Involvement of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2. J Pharmacol Exp Ther 1998; 285: 236-241.
10. Thom SR, Kang M, Fisher D, Ischiropoulos H. Release of glutathione from erythrocytes and other markers of oxidative stress in carbon monoxide poisoning. J Appl Physiol 1977; 82: 1424-1432.
11. Stamler JS, Piantadosi CA. O=ONO: It's CO. J Clin Invest 1996; 97: 2165-2166.
12. Ischiropoulos H, Beers MF, Ohnishi ST, Fisher D, Garner SE, Thom SR. Nitric oxide production and perivascular tyrosine nitration in brain after carbon monoxide poisoning in the rat. J Clin Invest 1996; 97: 2260-2267.
13. Sasaki T. On half-clearance time of carbon monoxide hemoglobin in blood during hyperbaric oxygen therapy. Bull Tokyo Med Dent Univ 1975; 22: 63-77.
14. Uchiyama T, Harafuji K. Life-saving effect of pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate on carbon monoxide intoxication of rabbits. Artif Organs 1994; 18: 576-587.
15. 内山利満, 服藤恵三. 一酸化炭素中毒の治療:動物実験におけるpyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP) の有用性と推察される機序. 人工血液1995; 3: 89-95.
16. Iwasaki K, Iwashita Y, Ikeda K, Uematsu T. Efficacy and safety of hemoglobin-polyethylene glycol conjugate (pyridoxalated polyethylene glycol hemoglobin) as an oxygen-carrying resuscitation fluid. Artif Organs 1986; 10: 470-474.
17. Kida Y, Maeda M, Iwahita Y, Goto K, Nishi K. Effects of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate and other hemoglobin-related substances on arterial blood pressure in anesthetized and conscious rats. Artif Organs 1995; 19: 117-128.
18. Schultz SC, Grady B, Cole F, Hamilton I, Burhop K, Malcolm DS. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. J Lab Clin Med 1993; 122:301-308.
19. Keipert PE, Gonzales A, Gomez CL, Macdonald VW, Hess JR, Winslow RM. Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspirin-crosslinked hemoglobin solution. Transfusion 1993; 33:701-708.
20. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. Anal Biochem 1993; 214: 11-16.
21. Motterlini R, Vandegriff KD, Winslow RM. Hemoglobin-nitric oxide interaction and its implications. Transfusion Med Rev 1996; 10: 77-84.
22. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43: 109-142.
23. Schmidt HHHW. NO<sup>•</sup>, CO and •OH Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. FEBS Lett 1992; 307: 102-107.
24. Kharitonov VG, Sharma VS, Pilz RB, Magde D, Koesling D. Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 2568-2571.
25. 伸井邦彦, 佐久間一郎, 北畠顕. ヘモグロビン系酸素運搬体による血管反応. 人工血液1998; 6: 25-36.
26. Sakuma I, Asajima H, Fukao M, Tohse N, Tamura M, Kitabatake A. Possible contribution of potassium channels to the endothelin-induced dilatation of rat coronary vascular beds. J Cardiovasc Pharmacol 1993; 22(Suppl.8): S232-S234.
27. Rhodes PM, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. Biochem Biophys Res Commun 1995; 209: 590-596.
28. Sakai H, Tsuchida E. Physiological roles of messenger molecules(NO,CO). Chemistry 1996; 51: 664-665.
29. 下川宏明. NO研究—その後の展開—. 最新医学1997; 52: 909-918.
30. Marks GS, Brien JF, Nakatsu K, McLaughlin BE. Does carbon monoxide have a physiological function? Trend Pharmacol Sci 1991; 12: 185-188.
31. 森健次郎, 篠村徹太郎. 情報伝達物質としてのNOと臨床医学. 治療学1995; 29: 1304-1305.
32. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. FASEB J

- 1988; 2: 2557-2568.
33. Brüne B, Schmidt K-U, Ullrich V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem* 1990; 192: 683-688.
34. Thom SR, Ohnishi ST, Ischiropoulos H. Nitric oxide released by platelets inhibits neutrophil B<sub>2</sub> integrin function following acute carbon monoxide poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 128: 105-110.
35. White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992; 31: 6627-6631.
36. McMillan K, Bredt DS, Hirsch DJ, Snyder SH, Clark JE, Masters BSS. Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11141-11145.
37. Fan Y-P, Chakder S, Rattan S. Inhibitory effect of zinc protoporphyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 468-474.

## トピックス

# 赤血球代替物の臨床応用の可能性

## The potential of red blood cell substitutes in the clinical settings

照屋 純<sup>1)</sup>, 佐久間一郎<sup>2)</sup>, 伸井邦彦<sup>3)</sup>, 佐藤 洋<sup>3)</sup>, 北畠 顯<sup>2)</sup>  
Jun Teruya<sup>1)</sup>, Ichiro Sakuma<sup>2)</sup>, Kunihiko Nakai<sup>3)</sup>, Hiroshi Satoh<sup>3)</sup>, Akira Kitabatake<sup>2)</sup>

### 和文抄録

赤血球代替物の臨床応用の可能性について、輸血臨床の視点から考察した。現状の代替物はいずれも血中半減期が短く、同種血輸血回避を意図する用途は依然として限定されており、より特定の輸血副作用回避を目的とした使用が期待される。具体的な例を、適当な同種血が間に合わないケースを中心に挙げた。また、最近の開発研究では臨床研究の過程で副作用が明らかとなる場合が少なくなく、副作用について基礎研究の重要性をあらためて指摘したい。輸血臨床に携わる者として、同種血以外の選択肢があれば輸血医療の幅を一層拡大することも可能であり、代替物への期待は極めて大きく、早期実現を願うものである。

### Abstract

The potential of red blood cell substitutes was discussed from the view point of transfusion medicine. The half-life time of the currently developed products are very short in comparison with red cells, and therefore those products should have a limited use. In this context, we must consider more specific applicable use of such products; we presented some possible cases in which artificial products are very useful. In addition, the safety and adverse effects of artificial materials are still important; indeed, several large clinical studies for blood substitutes have been canceled or interrupted recently due mainly to the occurrence of adverse effects. This emphasizes that the basic researches are still very important. Artificial blood can bring a significant impact on the modern transfusion medicine. We absolutely expect early realization of useful artificial red blood cell substitutes.

### はじめに

酸素運搬体開発の現状に関して、製造法や酸素運搬能に関する研究は盛んであるものの、輸血臨床に関わる立場からは血中半減期や生体適合性も決して軽視できない重要な課題と考えられる。まず第1に、いずれの赤血球代替物も血中半減期は十数時間から1日程度である。同種血輸血の代替と回避を標榜しようと、いずれ循環系から姿を消す以上、血中Hb濃度を維持するには同種血輸血の追加が必要となろう。それでは輸血代替の意味をなさない。第2に、ヘモグロビン(Hb)系酸素運搬体とは異なりここまで順調に研究開発・臨床試験が進められてきたペーフルオロケミカル(PFC)製剤について、ごく最近になって脳卒中の頻度が高くなることが判明し、フェーズ3の中止が余儀なくされた。依然として基礎研究と副作用対策が重要であることが浮き彫りとなった形である。本稿では輸血臨床の立場から、赤血球代替物の臨床応用の可能性について述べてみたい。

### 1. 同種血輸血の問題点

同種血輸血は、梅毒、肝炎、エイズという輸血後感染症の歴史を経て、近年、その安全性が非常に高められてきた。しかし、ウインドウペリオド、すなわち感染をうけてから検査で検出可能となり陽性判定が可能となるまでの期間があるため、感染症の完全な予防は不可能であり、米国では輸血後感染症の危険性は、エイズが約60万単位に1度、C型肝炎が10万単位に1度、B型肝炎が6万単位に1度という可能性で発症すると言われている。近い将来、PCRを用いたNAT(nucleic acid testing)が実際に導入されれば、輸血によるウィルス感染の危険性は、限りなくゼロに近づくであろう。ただし、日本ではすでにNATが導入され、効果を発揮しているものと推測されるが、プール検体での検査であり、検出感度や擬陽性の取り扱いなど、検討課題も少なくないと聞く。さらに、輸血後感染症のスクリーニング検査は、上記の疾患以外には、サイトメガロウィルスの検査

1) 米国ノースウェスタン大学医学部ノースウェスタンメモリアル病院輸血部長、血液凝固部長, Director of the Hemostasis Co-director of the Blood Bank Northwestern Memorial Hospital 251 E. Huron Street Chicago, IL 60611 2) 北海道大学医学研究科循環病態内科学, 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目, Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University, Graduate School of Medicine, N-15 W-7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan 3) 東北大学医学系研究科環境保健医学, 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1, Environmental Health Sciences, Tohoku University School of Medicine, Seiryo 2-1, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

が行われているにすぎず、その他ウィルスや細菌汚染などの検査はなされていない。例えば、新しいウイルス肝炎としてTTVが近年報告されているが<sup>1)</sup>、この疫学や感染性に関してはまだ未知な部分が多い。またクロイツフェルトヤコブ病は輸血によって伝播されることが最近動物で証明され、満足すべき検査法がなく、それらの除外は詳細な問診によるしかない。これらの疾患が実際の輸血後感染症として問題となるケースは極めてまれと予想されるが、血液センターにおける検査では費用対効果を考慮せざるを得ず、全ての感染性因子を排除することは到底不可能である。同種血輸血は本質的にそのような欠点をもつことを認識すべきであろう。

ただし、輸血後感染症の回避に人工物を使用するという論理も必ずしも妥当ではない。輸血後感染症を回避するには、全ての同種血輸血を機械的に人工物で代替することを意味するが、現状の酸素運搬体の血中半減期は短く、同種血による曝露を軽減するまでの貢献はかなり限定的になものになるのではなかろうか。それならば輸血後感染症回避への寄与もまた限られたものとならざるを得ない。

一方、輸血による副作用は、輸血後感染症にとどまらず、不適合輸血による溶血、細菌汚染、アナフィラキシー、TRALI(transfusion related acute lung injury)などの重篤なものがあげられる。それらの副作用は、頻度は少ないながらも常に発症が報告されている。以上のような現況から、現在でも、輸血製剤は数ある薬剤の中で最も副作用が重大なものであると言えよう<sup>2)</sup>。

## 2. 赤血球代替物の臨床応用の可能性

赤血球代替物は、上記を含めた様々な副作用を回避する手段として、多大な期待がよせられたのであるが、その臨床応用に関しては必ずしも初期の目的にそうものではなかった。人工赤血球という名が示すように、人由来の赤血球に完全に代わり得る物の開発が期待されたが、血中半減期は短く、定期的に赤血球輸血を必要とするような慢性貧血に対する臨床応用は、現時点においては不可能と考えられる。外科領域であっても、一時的に輸血を代替し得ても、半減期が短く同種血輸血の補充が必要となる。同種血輸血の回避という視点で考えるならば、その臨床適応範囲はかなり狭いと考えるべきである。

それでは、同種血輸血は全ての場合において人工物よりも優れているであろうか。人工物は血中半減期が短くとも、同種血輸血に対する優位性はないものであろうか。例えば、脳死由來の肝臓移植は、前もって予定を立てることが不可能であり、臓器保存の観点から、臓器が入手出来次第、可及的速やかに適合血を少なくとも15単位（日本では30単位に相当）準備する必要がある。ところが、稀な血液型や、2つ以上の赤血球抗体をもつ患者の場合は、全米のネットワークを通して適合血を探すために、実際に手にはいるまでに少なくとも数時間要する。しかも、天候の状況などによっては空港が閉鎖されたりすることもあり、そのような場合、外科医と輸血医とは移植を断念するか、あるいは何時間後に入手できるという予測のもとに手術をスタートするという選択にせまられる事態も生ずる。

以下が、米国で経験された一時的な赤血球代替物を必要とした事例である。

- ・心臓移植がセットアップされて、患者が手術室に行ったにもかかわらず、赤血球抗体がスクリーニングで見つかった。夜中であったため、赤血球抗体同定と適合血を調達するという時間を考慮して、移植を断念せざるを得なかった。患者はその3週間後に、新たな心臓提供者が現れる前に心不全で死亡した。
- ・自宅で肝移植を2年ほど待っていた患者は、3つの赤血球抗体があったために、適合血は500分の1という確率でしか見つけられず、シカゴ近郊の血液センターからは、手術開始までに必要準備量の半分の8単位しか用意できなかった。幸いに肝移植のフェーズ2（患者肝臓の摘出）の前までに残りの適合血を準備することができ、手術は無事終了した。
- ・死体腎移植が2時間後に予定されたが、患者は抗Jk 3という赤血球抗体を持っており、JK 3抗原陰性の血液は米国本土には無いことがわかった。ハワイの血液センターに2単位見つかったが、空輸するのに少なくとも8時間を要する事が分かり、患者も同意の上、輸血が用意できないままに手術を開始した。出血量が少なかったために、輸血を必要とせずに手術は終了した。
- ・クモ膜下出血で緊急開頭術が必要であったが、高頻度抗原に対する赤血球抗体が見つかり、数時間後に抗Uであることが同定され、適合血を空輸するのにさらに数時間要することがわかった。手術は開始され、術中に出血したもの適合血がその時までに間に合ったため、輸血をして無事に手術を終了することが可能であった。
- ・分娩時に大量の出血があったが、患者がエホバの証人であったために輸血が不可能であり、ヘモグロビンが最低1.3g/dLにまで低下した。約10日後にはヘモグロビンは5g/dL以上に回復したものの、脳に低酸素による障害が残った。
- ・力価の高い温式赤血球自己抗体による自己免疫性溶血性貧血があり、赤血球輸血を繰り返しても、ヘモグロビン値が増加しなかった。

以上のうち、最終的に適合血の輸血を行うとしても、最後の例を除き赤血球代替物は急性期の時間かせぎとして極めて重要な役割を果たすことが期待されよう<sup>3,4)</sup>。また、自己免疫性溶血性貧血であっても、急性期を乗り越えるための緊急避難的な用途としての活用もあるかもしれない。最近、Biopure社の臨床試験中の細胞間架橋型Hb修飾体製品が緊急避難的に重度の自己免疫性溶血性貧血に応用され、その症例報告がなされている<sup>5)</sup>。

## 3. 貧血治療への応用

貧血には半減期が短い人工物の応用は不可能と述べた。何故なら、頻回の繰り返し投与が必須となり、鉄負荷などを考えてもリスクが大きい。ただし、慢性貧血が急速に悪化する際の緊急避難的な応用が可能かもしれない。地中海貧血などへの応用の試みもある<sup>6)</sup>。人工代替物には膜抗原がないことを利用し、自己免疫性溶血性貧血への応用もその一つと考えられ、前述のBiopure社の製品を用いた症例もその1つである。以下に詳細に紹介する。

症例は、21歳の女性であり、特発性血小板減少症の治療にPredonizoneが著効し退院したものの、12日後に自己免疫性貧血となり再入院、Htは7.5%まで低下した。その後の貧血治療で同種血輸血を受けつつ糖質グルコルチコイド、アフェレーシス、脾臓摘出、免疫グロブリン投与等の治療を試みるも貧血には効果が見いだせず、溶血が激しくなった段階で臨床試験中の細胞間架橋型Hb修飾体の実験的投与が開始された。投与基準は、血中Hb濃度が4%を切るか、組織の虚血兆候が見られた場合とされた。投与されたHb修飾体は、臨床試験中のウシHb修飾体(Biopure社製造HBOC-201)であり、インフォームド・コンセント取得後に使用された。投与開始の契機からはなかなか劇的な状況が伺える。患者のHtが36時間に渡って減少し13.8%となり、頻脈(心拍130/分)と血中乳酸値の上昇(2.2 mmol/L)が認められ、組織の虚血が示唆された。その段階で投与開始が決断され、まず60gのHBOC-201が4時間かけて輸血された。その間にもHtは6.4%にまで低下、Hb濃度3.7%(うち1.6%はHBOC-201由来)にまで減少した。しかしながら、患者の容態は急快復し、心拍数70-90/分、心電図上でも虚血の兆候は消失したと述べられている。最終的には1週間に渡り合計11単位、330gの修飾Hbが投与され、血中濃度は最大で3.4%となったという。貧血治療では、最終的にcyclosporineによる化学療法で溶血性貧血を抑えることができ、患者は無事退院した。予後も良好であり、8ヶ月後も健康に生活している。本症例は、内科的な貧血に対して同種血が使用できない際に人工物を用いて緊急避難することの可能性を示唆する好例であろう。このようなケースでは救命に大きく貢献することができ、開発研究の意義も大きいものと考えられる。

#### 4. 副作用の解明と対策について

赤血球代替物の研究開発は最初の臨床試験が開始されてすでに10年近い年月が過ぎた。しかしながら、未だに認可には至っておらず、逆に膨大な研究開発費が投入された後に開発が中止または中断するケースが目に付く。例えば、Baxter社は分子内架橋型Hb修飾体を開発し、出血性ショックのフェーズ3で死亡率が増加したため欧米の臨床研究の中止または中断を余儀なくされた<sup>7)</sup>。一方、Allaince社はPFC製剤であるOxygentの研究開発を行い、きわめて順調にフェーズ3まで到達したが、ごく最近になって心臓バイパス手術時の自己血支援に応用し、患者群で脳卒中が増えることが判明、本年1月8日にフェーズ3の中止を表明した。現時点で詳細なコメントは不可能であるものの、基礎研究と副作用のメカニズム解明の重要性をあらためて強く示唆るものとなった。(ただし、3月13日付でAllaince社はOxygentによる脳卒中発生のリスクが対照群と差がなく、5月にも臨床試験再開を予定していることを発表した。興味のある方は、<http://www.allp.com/press/press.exe?@B0313>にアクセスされたい。)

新しい製剤の開発で機能面の研究開発が優先することは理解できるが、人工物を使用するユーザーの立場からは、生体適合性と副作用も極めて重要な課題であり、そこを抜きには何も語れない。特に、優秀な新薬が基礎研究の段階で副作用を軽視ま

たは見落とした結果、臨床試験開始後にそれが発覚し、多くの場合、再び薬剤設計に戻って前臨床試験を含む膨大な作業をやり直すということは行われず、せっかくの優秀な薬が葬り去られた事例は枚挙にいとまがない。輸血代替では投与量も通常の薬に比べて多くなり、生体適合性には一層の配慮が求められる。研究開発側には迅速な臨床応用展開とともに、十分な基礎研究を切に願いたい。

また、赤血球代替物の臨床開発には、米国で行われているような綿密な費用対効果算出に基づく医療経済学的検討が必要であることは言うまでもない。優秀な新薬が開発されたとしても、製薬企業が採算の期待できない薬剤を導入し、巨額の費用を要して、しかも失敗のリスクが少なくはない臨床開発を推進することが出来ないのは当然であろう。これも日本製赤血球代替物創製のためには、解決しなければならない重要なファクターのひとつであるように思われる。

#### まとめ

- ・血液代替物は慢性貧血への使用の可能性は低く、急性期の使用、ことに同種血の調達が速やかにできないような臨床例に有用である。
- ・同種血輸血のウィルス感染に関しては、NAT導入後は極めて安全性が高まることが予想されており、コストの面からも、ウィルス感染回避という点のみでは、血液代替物の使用は正当化されないであろう。
- ・同種血輸血の重篤な副作用には、溶血、細菌汚染、TRALI、抗体形成などの、予知が不可能でしかも臨床的に無視できないものが少なくないため、その観点から血液代替物の使用の意義はある。
- ・生体適合性の課題は依然として重要であり、迅速な臨床展開を念頭に置いた研究開発とともに、十分な基礎研究が求められる。
- ・以上の点において、そこには当然に医療経済学的な視点も今後求められよう。

#### 参考文献

1. Greenburg AG, Kim HW. Use of donor blood in the surgical setting potentials for application of blood substitutes. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 25: 25-9, 1997.
2. Ikeda H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. Journal of Hepatology. 30:205-12, 1999.
3. Creteur J, Sibbald W, Vincent JL. Hemoglobin solutions—not just red blood cell substitutes. Crit Care Med 28:3025-34, 2000.
4. Scott MG, Kucik DF, Goodnough LT, Monk TG. Blood substitutes: evolution and future applications. Clin Chem 43: 1724-31, 1997.
5. Mullon J, Giacoppe G, Clagett C, McCune D, Dillard T.

- Transfusions of polymerized bovine hemoglobin in a patient with severe autoimmune hemolytic anemia. N Engl J Med 342:1638-43, 2000.
6. Gonzalez P, Hackney AC, Jones S, Strayhorn D, Hoffman EB, Hughes G, Jacobs EE, Orringer EP. A phase I/II study of polymerized bovine hemoglobin in adult patients with sickle cell disease not in crisis at the time of study. Journal of Investigative Medicine. 45:258-64, 1997.
  7. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, Rodman Jr G, DCLHb Tranmatic Hemorrhagic Shock Study Group. Diaspirin Cross-Linked Hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. A randomized controlled efficacy trial. JAMA 282:1857-1864, 1999.
  8. 仲井邦彦, 佐久間一郎, 福島昭二, 竹内由和, 佐藤洋, 北畠顯. パーフルオロケミカル(PFC) : 第2世代PFCによる挑戦. 人工血液 8:43-51, 2000.

## 海外文献紹介

Nature 1997; 386(6): 29-30 (Published in Japan by Nature Japan K.K.)

### トランスジェニック植物由来ヒトヘモグロビン

### Human haemoglobin from transgenic plant

Wilfrid Dieryck, Josée Pagnier, Claude Poyart, Micheal C. Marden,

(国立衛生医学研究所, フランス)

(Inserm U299, Hôpital de Bichétre, France)

Véronique Gruber, Philippe Bournat, Sylvie Baudino & Bertrand Mérot

(Cezeaux大学, フランス)

(Biocem, Groupe Limagrain, Campus Universitaire des Cézeaux, France)

津田良夫

**Yoshio Tsuda**

#### 訳者からのコメント

本誌「人工血液」にとっては、素材作りの話はあまり目にする機会は少ないとと思うが、昨年度の本誌に、組換えアルブミンの生産／開発に関する総説を載せて頂いた。この総説では、ヒト血漿蛋白質の中でもっとも産生量の多いヒトアルブミンをピキア酵母で大量生産するまでの研究開発の経緯を紹介したものである。ヒト血漿蛋白質を様々な宿主により産生させる試みは数多くなされている。宿主として、例えば、大腸菌、酵母、動物細胞（チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞：CHO細胞）、あるいはトランスジェニック動物で産生する類の報告は数多くある。1990年代に入ると、トランスジェニック植物で有用蛋白質を産生させる報告が散見され、現在は抗体と抗原（ワクチン）を産生させる研究が盛んに進められている。植物に分泌型IgAを産生させ、経口摂取により、免疫能を高める検討が成されており、一部では既に臨床試験が開始されている<sup>1)</sup>。

今回、紹介する文献はNature誌に発表された科学的書簡、短い報告である。1997年に発表されて以降、新しい報告が見出されないことから、可能性を確かめた後、研究がストップしている可能性も考えられる。最近の分子農業（molecular farming）の文献、総説を見ると<sup>2,3)</sup>、多くのVentureにより抗体関連の報告が多くあり、組換えヒトヘモグロビンの様な、生産量を多く、静脈内投与が可能なまでに純度を上げること等、困難の予想される研究よりも、まず実績をあげるために抗体の産生研究に集中して進められているようだ。ヒトヘモグロビンを植物に作らせる研究はまだまだプリミティブなものと言わざるを得ないが、

将来の可能性を考えて紹介することにした。すなわち、植物体によって、ヘモグロビンのような複雑な構造を持つ機能的な蛋白質を生産することができる。しかも安価に、安全性の高いものを作る可能性が植物体にはある。

酵母あるいは動物細胞での産生を手がけてきた訳者にとっては、トランスジェニック植物の参入はかなりの脅威に思っている。例えば、組換え蛋白を細菌で産生させた場合の問題点としては、翻訳後の修飾がないことや、分泌されずに菌体内で不溶化し再構成の問題が考えられる。また、酵母で産生させた場合の問題点としては、マンノースに富む糖鎖の付加が新たな抗原性の問題と絡んでくる。アルブミンの場合には、糖鎖が付かない単純蛋白質なので、この問題はなかったが、通常の蛋白質では大きな制約になっている。一方、動物細胞で産生させる場合には、生産性が一番の問題となり、大量培養槽の設備投資に見合うだけの採算性を勝ち得るのは至難の業である。他方、トランスジェニック動物による産生に関しては、動物の飼育管理を十分に行う必要性や、感染性物質（ウィルス、プリオン等）の汚染の懸念をどうしても拭い去ることができない。そこで、トランスジェニック植物の登場である。植物の栽培には、水、空気、光、土地があれば、大規模な設備投資を必要としない。生産規模の拡大や縮小は簡単に対応できる。もっとも大きな利点としては、哺乳類に広く分布する病原体の感染を受けない。植物体で産生させる課題はまだ多いと思うが、中々魅力的な産生系と考えている。

さて、本文献は短報のため梗概もないで、Meristemという

ベンチャー企業の研究者が出した総説<sup>4)</sup>より、この研究を紹介している文章があるので、抜粋する。

#### (梗概)

機能的なヒトヘモグロビンを産生するトランスジェニックタバコを作り出すことに成功した。緊急用に使用されるヘモグロビン血液代替物は、期限切れの輸血や牛血液から調製されているが、感染性病原体による汚染の可能性を完全には否定することが難しい。活性を有するヘモグロビンは2個の $\alpha$ -グロビンと2個の $\beta$ -グロビンからなる4量体である。機能的な分子としては、さらに、グロビン1分子に1分子のヘム分子が結合している。組換え技術により、機能的なグロビンを調製するためには、2種類のグロビンを等量ずつ產生させることだけでなく、ヘムの存在が必要であり、しかもそれらを会合させて安定で活性のある4量体のヘモグロビン分子にする必要がある。著者らは、ヒト由来の $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖のグロビン遺伝子発現を、カリフラワーモザイクウィルス(CaMV) 35Sプロモーターで制御する共発現ベクターを導入したトランスジェニックタバコを作り出した。產生されたポリペプチド鎖はクロロプラストに送られ、ヘム分子の存在下で会合した。トランスジェニックタバコの植物体の抽出物中にはヒトヘモグロビンが発現していた。生理的な試験で組換えヒトヘモグロビンは機能的に活性体であり、酸素運搬体としての機能を果たす可能性が示された。このように、トランスジェニック植物は、複雑な構造のヒト蛋白質産生のためのバイオリアクターとして有用である。

現在ではヘモグロビン関連血液代替物は、期限切れの保存血や牛血液、並びに細菌、酵母あるいはトランスジェニック動物による発現系から得たヘモグロビンを原料として使った開発が進められている。精製ヘモグロビンの酸素結合能や安定性の問題に関しては、架橋構造と位置を特定した変異技術との組合せにより、制御が可能になりつつある。しかし、ヘムの酸化や感染性物質の存在のようなその他の問題については未だ解決されていない。植物は生物資源の安価な供給元としてみなされることから、トランスジェニック植物は従来とは異なる最適なヘモグロビンの产生方法となりうるものだろう。既に、トランスジェニック食物は市場に出されつつあるのが現状である。我々は、トランスジェニックタバコでヒトヘモグロビンHbAの $\alpha$ -と $\beta$ -グロビンを共発現させることによって、機能的な4量体のヘモグロビンを產生させる可能性を示すことができた。

(以下の部分は発現系の説明であるが、あまりにも簡単すぎ、内容把握するためには引用文献を参照する必要がある。各文献をもとに少し膨らませ紹介する。)

発現した遺伝子産物(ヒト $\alpha$ -グロビンとヒト $\beta$ -グロビン)をクロロプラストへ移送させるために、 $\alpha$ -グロビンと $\beta$ -グロビン遺伝子を、クロロプラスト移送ペプチドをコードするDNA配列に融合させた。移送ペプチドにはPisum属(エンドウ)のクロロプラスト局在蛋白であるRubiscoのSmall Subunit前駆体のN末端側の57アミノ酸残基を用いた<sup>5)</sup>。カリフラワーモザイクウィルス(CaMV) 35Sプロモーターは植物における異種遺伝子の構成的発現に使用される代表的なプロモーターであり、このプロモーターに $\alpha$ -グロビン融合遺伝子及び $\beta$ -グロビン融合遺伝子をつないだ発現カセットをそれぞれ作製し、さらに2つの発現カセットを結合して $\alpha$ -グロビン及び $\beta$ -グロビンの共発現が可能なプラスミドを作製した<sup>6)</sup>。次に、これをアグロバクテリウム法と呼ばれる遺伝子導入法によりタバコに導入した。アグロバクテリウムは植物にCrown gallという腫瘍を形成させる土壌細菌であるが、遺伝子導入には腫瘍形成する遺伝子を欠失させた株を用いた。マーカーとして抗生物質耐性遺伝子を含んだ発現プラスミドをアグロバクテリウムに導入し、これを植物に感染させると、アグロバクテリウムが保有する遺伝子の一部が植物細胞の染色体に組込まれる<sup>7)</sup>。この様にして得た抗生物質耐性の組換え植物組織から $\alpha$ -グロビン及び $\beta$ -グロビンを共に発現しているものをウエスタンブロッティングによりスクリーニングした。

形質転換された植物体の半数以上で、種子(抽出された蛋白総量の0.05%程度)及び根からの抽出物にグロビンが確認された(図1)。組換えグロビンは天然のグロビンと似通った分子量を示し、移送ペプチドがうまく切断されていることを示唆していた。我々はタバコの種子より組換えヘモグロビン(rHb)を抽出し、2種類の連続したクロマトフラフィーにより精製した。

図1 トランスジェニックタバコ種子から得た粗抽出物中の $\alpha$ -及び $\beta$ -グロビンのウエスタンブロッティングによる検出。

レーン1 75 $\mu$ g蛋白、野生株からの抽出物、  
レーン2 75 $\mu$ g蛋白、トランスジェニック植物体からの抽出物、  
レーン3 分子量マーカー、  
レーン4 50ngの精製ヒトヘモグロビン。

ウエスタンブロッティングはウサギの抗ヒトヘモグロビン血清と、アルカリリフォスマターゼを結合させたヤギの抗ウサギIgG抗体で検出した。

rHbの機能解析のため、瞬時光分解法(Flash photolysis)を行った。すなわち、ヘモグロビン4量体を用いたリガンドの再結合における速度変化は、特徴的な二相性の形状を示す。野生株の種子からの抽出物にヒト血液から精製したHbAを加えた場合、一酸化炭素の再結合の速度変化は二相性を示し、この系でHbAが安定であることが示された(図2、0.1気圧のCO雰囲気下)。次に、タバコ種子抽出物から精製した組換えヘモグロビンもHbAと似通った速度変化を示した(図2)。1気圧のCO雰囲気下におけるこの検体の再平衡は、二分子反応速度式で示されるが、期待通りに加速された(図2)。HbAに関しては、オキシヘモグロビンでは弱い一時的な吸収シグナルしか示さなかったが、CO/O<sub>2</sub>の混合雰囲気下では、安定なHbCO体の光解離により、急速な酸素の結合が観察された(図2)。図中には示されていないが、1秒程度を要して、非常にゆっくりとO<sub>2</sub>からCOへの置き換えが起きた。

図2 0.1, 1気圧CO雰囲気下あるいはCO/O<sub>2</sub>混合雰囲気下の平衡状態におけるトランスジェニック植物から抽出されたrHbのリガンド再結合速度。

植物抽出物に加えたHbAの速度変化及び対照とした野生株(WT)の抽出物の結果も図示した(0.1 atm CO)。ΔAは吸光度変化を示し、光分解には532nmの光を10n秒のパルス照射し、検出は436nmとした。

これらの結果は、非常に複雑な多量体蛋白質である機能的なヒトヘモグロビンを、植物体から調製することができることを示している。タバコはモデル系として使ったが、他の種で実施すれば、より簡便な精製工程や滅菌工程を組み込み、さらに高収率で生産することも可能であろう。トランスジェニック植物はrHbの大量製造にとって少なからぬ優位な点を提供できる。すなわち、細菌や動物由来の汚染を免れることができるだけでなく、供給量に限界のある期限切れヒト血液に依存する問題点も和らげができるであろう。

以上

#### 参考文献

1. Ma JK-C, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature Med.* 1998; 4: 601-606.
2. 岡田吉美. 組換え植物による医薬品の生産. 蛋白質核酸酵素 2000; 45: 607-613.
3. 村松健. 植物での動物タンパク質の生産. BIO INDUSTRY 2000; 17: 15-22.
4. Theisen M. Production of recombinant blood factors in transgenic plants. In: Shahidi et al., eds. *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999; 211-220.
5. Anderson S, Smith SM. Synthesis of the small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase from genes cloned into plasmids containing the SP6 promoter. *Biochem. J.* 1986; 240: 709-715.
6. Guerineau F, Lucy A, Mullineaux P. Effect of two consensus sequences preceding the translation initiator codon on gene expression in plant protoplasts. *Plant. Mol. Biol.* 1992; 18: 815-818.
7. Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 1985; 227: 1229-1231.

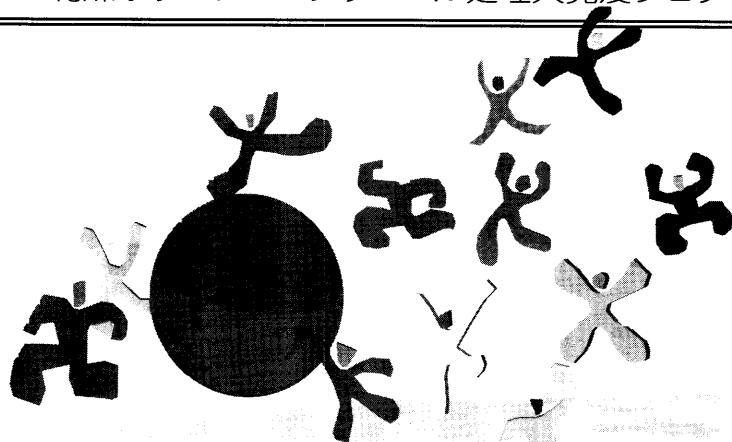
## 静注用人免疫グロブリン製剤

指定医薬品

薬価基準収載

## 献血グロベニン-I-ニチヤリ<sup>®</sup>

〈乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン〉



■ 効能・効果、用法・用量、使用上の注意(禁忌)等については、添付文書をご参照ください。

製造〔資料請求先〕



日本製薬株式会社

〒101-0031 東京都千代田区東神田一丁目9番8号

販売

△ 武田薬品工業株式会社

〒540-8645 大阪市中央区道修町四丁目1番1号

2000年10月作成(K)

## 第8回血液代替物国際会議

### VIII<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (VIII-ISBS)

November 9-11, 2000

San Diego, California, USA

Conference President: Robert M. Winslow, M.D. (Sangart, Inc)

宗 慶太郎

Keitaro Sou

第8回血液代替物国際会議 (VIII-ISBS) は米国カリフォルニア州サンディエゴでDr. Winslow R.M.を大会長として11月9～11日に開催された。この地での血液代替物国際会議は第6回に続いて2度目の開催となり、関連のシンポジウムもよく開催される血液代替物に縁の深い町である。会場となったのは海に面したHotel Hyatt Regency San Diegoで、会期中にPlenary lecture 4件、Invited lecture 4件、Oral presentation 40件、Poster presentation 49件が行われた。筆者の印象に残った講演を幾つか紹介する。

Winslow, R.M. (Sangardt, Inc.)による総論から始まった。血液代替物の現状を踏まえ、開発を進めるに当っての3つの見解が述べられた。① 米国の輸血の現状では、Blood Bank communityにより献血血液の安全性は大幅に向上してきているが、一方で需要増大、供給量減少、コスト増大により血液不足はより深刻になっている。この現状から、血液と同等のコストで量産できることが必要とされている。新しい製剤の開発に当っては早い段階からコストに焦点を当てることが必要である。② 現在開発が進められている大部分の製剤は、微小循環動態や血管弛緩因子 (NOなど)について殆ど知見の無いときに考案されたものである。各種の知見が集積してきた今、セルフリー製剤は分子設計や使用目的など再考する必要がある。③ 臨床試験は複雑かつデータの解釈も困難であるにも関わらず、開発の早い段階で臨床試験に入る製剤が多いことを指摘し、安全性と効能を実証するためのプロトコール改良を念頭に置く必要があると述べた。

#### Chemistry and Physiology (Chairman: Winslow)

塩素イオンはHb酸素親和度の低下、T-state HbA構造の安定化など重要な調節剤として作用する。Hirsch, R.E. (Albert Einstein College of Medicine) はR-state Hb (HbA, HbC,

HbS)について塩素イオンの影響について検討し、塩素イオンの添加によりR-state Hbでは酸化や沈殿生成が促進され不安定化されることを報告した。最後に、血液代替物として開発されている修飾HbやリコンビナントHbについても塩素イオンの影響(酸素親和度、酸化、安定度)を調べる必要があると提案した。

Fabry, M.E. (Albert Einstein College of Medicine) はペーフルオロカーボン乳剤 (PFCE; 粒子径0.4μm以下) を鎌形赤血球病マウス (S+S-Antilles), および正常マウス (C57) に血液量の5～20%投与し、肝臓および腎臓のdeoxyHbをBlood Oxygen Level Dependent-Magnetic Resonance Imaging (BOLD-MRI) (JCI, 98, 2450-2455, 1996) を用いて検出した結果を報告した。S+S-Antillesマウスの肝臓および腎臓には正常マウスと比較しての多量のdeoxyHbが存在するが、PFCEを投与するとS+S-AntillesマウスのdeoxyHb量は正常マウスと同等になることから、鎌形赤血球病の症状改善にPFCEの投与が有効であると述べた。

Hbにポリエチレンギリコール (PEG) を結合させ、分子量を大きくすることで、セルフリーHbに認められるNO捕捉を回避することができる。Manjula, B.N. (Albert Einstein College of Medicine) はマレイミドを用いてHbのCys-93選択的にPEGを導入する方法を報告した。この場合、PEGはHb分子当たり2本結合する。この方法で分子量の異なるPEG (5K, 10K, 20K) を結合させたHb、あるいはPEG結合部位を変えたHbの溶液について分子の大きさ、溶液レオロジー、P<sub>50</sub>とPEG分子量や結合部位の相関について整理した。分子の大きさと溶液レオロジーはPEG鎖分子量に依存するが結合部位には依存しない。一方、P<sub>50</sub>はPEG鎖分子量には依存しないが結合部位に依存することが示された。

#### Clinical Development (Chairman: Kjellstrom)

このセッションでは10件の報告があったが、血液代替物の上市に凌ぎを削っている企業からの発表が7件あり注目を集めた。

Keipert, P.E. (Alliance Pharmaceutical) はパーフルオロカーボン乳剤OXYGENT<sup>TM</sup>について第2相試験の成績を報告した。OXYGENT<sup>TM</sup>のマーケティング、販売、工場生産はBaxterと共同で行い、300万units/yearで工場生産する見通しであることを述べ、上市が近いことをアピールした。

Lemon, D.D. (Baxter) は遺伝子組換え技術により產生されるHb(リコンビナントHb)について報告した。ストラテジーはHbのNO親和性の低下と分子量の増大を遺伝子組換えにより行うことである。リコンビナントHbのNO親和性はHbO<sub>2</sub>へのNO結合速度定数から評価し、ヘムポケット近傍の空間制御により3~60μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>の範囲でNO結合速度定数を制御できることを実証した。また、二量化したHbを產生することにより分子量の増大にも成功している。ラットへの投与試験ではセルフリーHbに認められる血管収縮や血圧上昇は観測されず、第二世代のHb製剤として期待できると報告した。

臨床第3相試験まで進み1998年に試験中断が報告されたdiaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb; HemAssist<sup>TM</sup>) であるが、Burhop, K.E. (Baxter) はrhesus monkey, pig, dog, sheep, ratについての前臨床試験の結果を報告した。DCLHbを投与した場合、NOトラップによる血管収縮により心筋障害が認められたが、動物種に依存するデータが示された。実験動物種の選定は難しい問題であるが、非常に考えさせられる結果であった。Carmichael, F.J.L. (Hemosol Inc.) はHEMOLINK<sup>TM</sup>の臨床第3相試験の成績を報告した。Vandegriff, K.D. (Sangart Inc.) はHb重合体の表面をポリエチレングリコールで修飾したHEMOSPAN<sup>TM</sup>について、血液と同等の溶液粘度を有し、微小循環動態が良好であるとその特徴を報告した。Hsia, C.J.C. (SynZyme Technologies LLC) はPolynitroxyl Hemoglobin (PNH)について報告した。血管弛緩因子と抗酸化を備えた特徴を有し、動物投与試験でも良好な結果が得られていることが述べられた。

#### Platelet Substitutes (Chairman: Levin)

Levinによる血小板代替物の総論から始まり、血小板代替物の必要性、現在開発が進んでいる各種血小板代替物が紹介された。また、血小板代替物の評価法については、in vitroでの機能評価は困難であるとし、動物実験による評価を推奨していた。現在のところ血小板や血小板代替物の効能を評価するための臨床試験プロトコールが無いため、この決定が重要であると述べられた。Nishiya, T. (Keio U.) はリコンビナント方式で產生させた糖蛋白質(rGPIIaIIa, rGPIbα)をリポソーム表面に固定化したrGPIIaIIa-, rGPIbα-, rGPIIaIIa-Ibα-liposomeについてその機能を報告した。Fischer, T.H. (U. North Carolina) は血小板膜蛋白質を架橋した後、凍結乾燥して得られる粉末を再度水和させたRehydrate, Lyophilized (RL) Plateletsについて、Tablin, F. (U. California) は凍結乾燥した血小板の保存につ

いて、Verhoeven, A. (CLB Sanquin) は血小板分散液を凍結融解し、洗浄して得られるInfusible Platelet Membrane (IPM)について各々報告した。

Oxidative Mechanisms (Chairman: Alayash), Microcirculation and Vasoactivity (Chairman: Intaglietta), Novel Products and Applications (Chairman: Chang), ポスターセッションにおいても興味深い講演が幾つかあったが割愛させて頂いた。Plenary lecture, Invited lectureについては以下に演題を示した。

#### Plenary lecture

1. Winslow, R.M. "Blood Substitutes: Current Status and New Challenges"
2. Tsuchida, E. "Recent Progress of Artificial Blood Project and Novel Products"
3. Chang, T.M.S. "Present Status of New Generation of Hemoglobin Products"
4. Intaglietta, M. "Microvascular, Mechanical & Cellular Basis for Effective Blood Substitutes"

#### Invited lecture

1. Bunn, F.H. "Oxygen Sensing and Oxygen-dependent Gene Expression"
2. Frangos, J. "Mechanisms of Flow Induced NO Production"
3. Alayash, A.I. "Oxidative Mechanisms of Hemoglobin-based Blood Substitutes"
4. Johnson, P.C. "Oxygen and Blood Flow Regulation: The Search for the Missing Link"

今会議では全発表97件中、米国からの発表件数が最も多く、米国での血液代替物への関心の高さを痛感すると共に、産・学・官（軍関係）何れからも最新の研究成果が報告され、国家プロジェクトとして研究が展開されている様子が伺われた。米国を初め世界各国ではセルフリー型の修飾ヘモグロビンの利用が主流であるが、NOのトラップによる血管収縮など、副作用の回避が焦点となっている。一方、セル型のヘモグロビン小胞体では、セルフリー型に見られる副作用は認められないものの、コストと量産が課題となっている。日本からは米国に次ぐ18件の発表があり、日本血液代替物学会を中心とした血液代替物の研究展開が世界を先導する立場にあることは明らかである。しかし、企業が競って臨床応用を進めている米国に比べ、最終段階に踏み込めていない点はやはり少し物足りなさを感じられた。近い将来世界に誇れる血液代替物を日本から発信する日がくることを期待したい。

## ●編集後記●

編集委員長を仰せつかってから、2年が過ぎようとしています。編集会議において毎回問題になるのは投稿原稿の「質」より「量」です。私としては自分なりにがんばってきたつもりですが、原稿の集まりが悪いのも、血液代替物研究に携わっていないとはいえ、自分の責任だと痛感しております。昨年は半年間の米国留学のせいで、副編集委員長の渡辺先生には多大のご迷惑をお掛けしました。年次大会の発表に対して当機関誌への投稿をお願いしても、それぞれの領域の雑誌との競合で、有力他誌に負けてしまいがちです。ある意味でニュースレターのような情報誌を目指すという道もありますが、学会機関誌として成り立たせるためには原著の投稿数が多くなくてはなりません。21世紀を迎え、日本血液代替物学会も飛躍の年にしなくてはなりません。人工血液自体が先端医療するために材料を多施設に潤沢に供給できないと云う事が論文の発表施設数の拡がりが無い事

の原因かもしれません。日本の血液代替物は世界の最先端の技術を持っていますが、臨床への応用が足踏み状態です。バクスター社の製品は内に様々な問題を抱えながらも臨床試験に果敢に打って出ました。結果は衆知の如く良くありませんでしたが、未知の領域に対する米国のフロンティアスピリットを見た気がします。日本の研究は模倣が多いと言えますが、血液代替物に関しては沢山のオリジナリティがあります。最初の一歩は勇気がいりますが、かつて故薄井彰博士が世界に先駆けて人工血液を使用したように、それを踏み出す気概を行政も、研究者も、医療関係者も、メーカーも持つべき時期だと思います。機関誌の編集委員としては不適切な発言かもしれません、あえて意見を述べさせていただきました。皆様のご寄稿をお待ち申し上げます。

(宮尾秀樹)



### 遺伝子組換えヒトG-CSF製剤

指定医薬品・要指示医薬品

薬価基準収載

**ナイトロジン**®  
NEUTROGIN®<sup>Injection</sup>

一般名 レノグラスチム(遺伝子組換え)

50 $\mu$ g  
100 $\mu$ g  
250 $\mu$ g



[資料請求先]  
中外製薬株式会社  
〒104-8301 東京都中央区京橋2-1-9

CNU8218

\*効能・効果、用法・用量、使用上の注意、取扱い上の注意等は製品添付文書をご参照ください。

# Bolster & Heal

献血であることの誇りと重責……

献血由来 生体組織接着剤  
**ボルヒール®**  
 BOLHEAL® 指 ■健保適用



●ご使用に際しましては製品添付文書をご参照下さい。

販売  
**TEIJIN** 帝人株式会社  
 医薬事業本部 〒100-8585 東京都千代田区内幸町2-1-1

製造元・販売  
**化血研**  
 熊本市大通1-6-1 〒860-8568

資料請求先：帝人株医薬事業本部第2学術部  
 化学及血清療法研究所営業部  
 B011 T9810 作成年月1998年10月

B52

## にっぽんの血液製剤です。

献血であることの誇りと重責……



**禁忌** (次の患者には投与しないこと)  
 本剤の成分に対しショックの既往歴のある患者

**原則禁忌** (次の患者には投与しないことを原則とするが、特に必要とする場合には慎重に投与すること)  
 本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者

冷蔵保存から室温保存になりました。

指定医薬品



血漿分画製剤  
 献血由来 静注用人免疫グロブリン製剤

**献血ベニロン-I®**

（乾燥スルホ化人免疫グロブリン）  
 生物学的製剤基準

Kenketsu Venilon®-I

本剤は、献血による貴重な血液を原料として製剤化されたものです。問診、感染症間連の検査等の安全対策を講じていますが、血液を原料としていることに由来する感染症の伝播等の危険性を完全に排除することはできないことから、疾病の治療上の必要性を十分に検討の上、必要最小限の使用にとどめるようお願いします。（使用上の注意）●ご使用に際しましては、製品添付文書をご参照下さい。

販売元・販売

製造元・販売

資料請求先：帝人（株）医薬医療事業本部学術情報部  
 （財）化学及血清療法研究所営業管理部

**TEIJIN** 帝人株式会社

医薬事業本部 〒100-8585 東京都千代田区内幸町2-1-1  
 資料請求先：帝人株医薬医療事業本部学術情報部

**化血研**  
 化学及血清療法研究所

熊本市大通1-6-1 〒860-8568  
 Phone096-344-1211 Fax096-345-1345

VE16-9908 作成年月1999年11月

## 投稿規定

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広く集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

### 執筆規定

ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、

第2頁以降に和文抄録、Keywords(英語で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。

- 4) 句読点はコンマ(,) ピリオド(.) とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbolフォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめる。
- 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μm, L, mL, μL, mol, g, mg, μg, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字はすべて英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
- 8) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では<sup>2)</sup>, <sup>3-5)</sup>, <sup>1)</sup>, <sup>4-6)</sup>などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名、論文題名、誌名西暦発行年；巻数：頁～頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌また

はIndex Medicusに準拠する。単行本の場合は全著者名、題名、編集者名、書名、発行地：発行書店、年号；頁～頁。の順とする。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
  2. 砂本順三、岩本清. リポソームの調製. 野島庄七、砂本順三、井上圭三編. リポソーム. 東京：南江堂、1988;21-40.
  3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
  4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
  - 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
  - 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ版権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。
- 掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを超える分についての費用は著者の負担とする（およそ1部100円）。カラーワイド写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

### 編集委員会

●宮尾秀樹(委員長)、池淵研二、武岡真司、津田良夫、友田燁夫、仲井邦彦、西出宏之、堀之内宏久、村田満、渡辺真純●

### 日本血液代替物学会 会誌

■発行 日本血液代替物学会

■編集・制作「人工血液」編集委員会

■印刷 株式会社 研恒社

### 人工血液 vol.9 (1) 2001年4月2日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL(03)5363-3493 FAX(03)5363-3499

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL(03)5363-3806 FAX(03)5363-3499

〒113-0034 東京都文京区湯島1丁目1番地12号

TEL(03)3253-5311 FAX(03)3251-5339

再生紙を使用