

目 次

人工血液

第9巻 第2号 2001年7月

- 総説 ヘモグロビンの酸化還元反応と共に役した
薬物代謝作用 友田燁夫 34

- 原著 NRC(Neo Red Cell:血液代替物)による
高度血液交換モデルの免疫能 柳田尚之 42

海外文献紹介

- 血液代替物による蘇生は外傷後の好中球による
病的細胞障害を抑制する 渡辺真純 46

Contents

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 9 No. 2 July, 2001

- Review: Drug metabolism coupled with oxido-reductive reactions of hemoglobin* Akio Tomoda 34

Original Article:

- Study on immune state of high grade blood exchange using NRC in rats* Naoyuki Yanagida 42

Topics: Resuscitation with a Blood Substitute

- Abrogates Pathologic Postinjury Neutrophil Cytotoxic Function* Masazumi Watanabe 46

第8回日本血液代替物学会年次大会会告

テーマ

「血液代替物をめぐる諸問題」 —臨床応用を目指して—

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 千代田区平河町2-7-5

TEL:03-3261-8386 FAX:03-3261-5449

プログラム

会長シンポジウム 「人工代替物開発の現状と今後の展望」

1. 我国の人工赤血球開発の現状

土田英俊／早稲田大学理工学総合研究センター

2. 化学修飾型ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体開発の現状と将来への展望

西 勝英／熊本大学医学部薬理学第二

3. パーフルオロカーボンの現状と今後の課題

北畠 順／北海道大学大学院医学研究科循環病態内科

4. 人工血小板／血小板代替物 開発研究の動向

池田康夫／慶應義塾大学医学部内科

5. 臨床に役立つヒト抗体開発の現状

黒澤良和／藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学

特別講演 I

The Unusual Properties of Effective Blood Substitutes

Marcos Intaglietta／Department of Bioengineering, University of California, San Diego

特別講演 II

Hemoglobin-based Blood Substitutes : Safety Evaluation and Mechanism of Toxicity

Abdu Alayash／Center for Biologics, Evaluation and Research, FDA

シンポジウム I 人工酸素運搬体の臨床適応へ向けての留意点

1. リポゾーム包埋型ヘモグロビン

末松 誠／慶應義塾大学医学部医化学

2. 全合成系酸素輸液：アルブミン-ヘム複合体—ヘム構造が酸素配位能力に与える効果—

小松晃之／早稲田大学理工学総合研究センター

3. SNO-PEG-Hbの生体適合性と臨床応用への可能性

佐久間一郎／北海道大学大学院医学研究科循環病態内科

4. Hemospan™: New Concepts, New Solutions

Robert M, Winslow/Sangart, Inc., San Diego, University of California, San Diego

5. パーフルオロカーボン設計上の課題と臨床との連係

福島昭二／神戸学院大学薬学部製剤学

シンポジウムII 人工血小板の臨床応用への可能性を探る

1. 血小板輸血の現状と人工血小板／血小板代替物の必要性

池淵研二／東京医科大学生化学

2. アルブミン重合体を用いた血小板代替物の開発

武岡真司／早稲田大学理工学総合研究センター

3. リポソームを用いた血小板代替物

西谷孝子／慶應義塾大学医学部内科

4. 培養骨髓巨核球から產生された血小板の形態と機能

長澤俊郎／筑波大学臨床医学系血液内科

教育講演I

E-CELLシステムによる赤血球細胞のシミュレーション

富田 勝／慶應義塾大学環境情報学部

教育講演II

植物発現系におけるサイトカイン並びに抗体の発現

杉本千尋／帯広畜産大学原虫病研究センター先端予防治療学分野

ワークショップ 人工血液の適応拡大をめぐる諸問題

1. 選択的脳冷却法で用いられる血液代替物質

太田富雄／富永脳神経外科病院

2. 超微小人工赤血球の急性脳梗塞における効果：ラット脳梗塞モデルによる実験的検討

川口 章／東海大学医学部心臓血管移植外科

3. 人工酸素運搬体を用いた腫瘍酸素化の検討

岩丸有史／国際晴嵐病院外科

4. 人工酸素運搬体の液体換気への応用について

田島敦志／慶應義塾大学医学部呼吸器外科

5. 人工酸素運搬体の臓器灌流についての考察

西 勝英／熊本大学医学部薬理学第二

6. 造血幹細胞と再生医療

西川光郎／キリンビール医薬探索研究所・探索グループ

7. 無輸血治療プログラムの現状とその有用性

有賀友則／ものの塔聖書冊子協会

8. 厚生労働省の科学技術政策と人工血液

鈴木英明／厚生労働省医薬局血液対策課

〈大会事務局〉 〒162-8666 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

TEL: 03-3353-8111 内 37231, 37232

FAX: 03-5269-7360

ヘモグロビンの酸化還元反応と共に役した薬物代謝作用

Drug metabolism coupled with oxido-reductive reactions of hemoglobin

友田 煉夫
Akio Tomoda

和文抄録

肝臓のチトクロームP450が薬物代謝に貢献していることは良く知られている。しかしながら、チトクロームP450と同様にプロトポルフィリンIX型ヘムを含むヘモグロビンの薬物代謝機能についてはほとんど注目されていなかった。本総説ではヘモグロビンや赤血球による薬物代謝機能についてこれまでの報告を解説し、ヘモグロビンの生理的意義を考察する。

Abstract

Drug metabolism by microsomal cytochrome P450 in the liver has been extensively studied hitherto. However, human hemoglobin, which contributes to the transport of oxygen in erythrocytes, and has protoporphyrin IX heme inside like cytochrome P450, has attracted little attention in terms of drug metabolism. Present reviews are concerned with the researches on drug metabolism by human hemoglobin, coupled with oxido-reductive reactions with human hemoglobin, or human erythrocytes and with the significance of the drug metabolism by human erythrocytes.

Keywords

cytochrome P450; hemoglobin; human erythrocytes; drug metabolism; oxido-reductive reactions

1. 緒言

薬物代謝は生体において解毒機構の一環として重要なものであるが、主として肝臓で行われる。この肝臓における薬物代謝はミクロソームに存在するチトクロームP450系によるものであることが数多くの論文により示されてきた¹⁻³⁾。一方、赤血球は生体を循環して、酸素の供給や炭酸ガスの処理に重要な役割を果たしている^{4,5)}。人体における全赤血球量は重量にして肝臓の2倍弱にも達することからもその重要性がうかがえる。赤血球において酸素の運搬に貢献しているのがヘモグロビンであり、赤血球中のタンパク質の98%以上を占めている。ヘモグロビンの機能についてはいまでもなく、酸素の脱着である^{6,7)}。

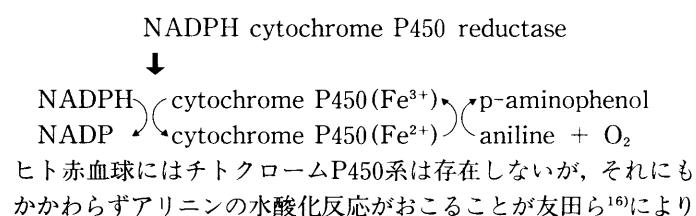
ヘモグロビンはチトクロームP450と同様にプロトポルフィリンIXを含むヘムタンパク質である。このことは赤血球内のヘモグロビンが薬物代謝の機能をもっている可能性を示唆している。しかしながらこのような観点から赤血球を取り扱った研究は非常に少ない。Mieyal^{8,9)}やCarrellおよびWinterbourne¹⁰⁾らはヘモグロビンにはoxidaseとしての機能があることを指摘した。また、友田らの研究でもヘモグロビンによりいくつかの薬物はヘモグ

ロビンの酸化還元反応と共に役して急速に代謝されることが明らかとなった¹¹⁻¹⁵⁾。

本論文ではヒト赤血球やヘモグロビンによる薬物代謝をヘモグロビンの酸化還元反応と関連させながらこれまでの研究を総括的に検討し、薬物代謝における赤血球とヘモグロビンの役割を考察する。

2. ヘモグロビンや赤血球による薬物の水酸化反応

肝臓のチトクロームP450による薬物の水酸化反応の代表例はアニリンの水酸化である³⁾。アリニンは次の反応でパラアミノフェノールへ水酸化される。



1976年に示された(Fig.1)。この場合、少量のメチレンブルーの存在により反応は約100倍まで促進された。赤血球中のヘモグロビンがoxidaseとして作用してアニリンがパラアミノフェノールへ水酸化され、またメチレンブルーは電子供与体として作用していると考えられる。同年にMieyalら^{8,9)}は精製したヒトヘモグロビンが酸素存在下で、NADHやジチオナイトなどの電子供与体を添加した場合、アニリンをパラアミノフェノールへ代謝することを明らかにした。また、CarrellおよびWinterbourne¹⁰⁾はヘモグロビンがfrustrated oxidaseとしての機能をもっていることを示唆した。

これらの結果はヘモグロビンあるいは赤血球中のヘモグロビンが薬物代謝に機能していることを示唆するものである。

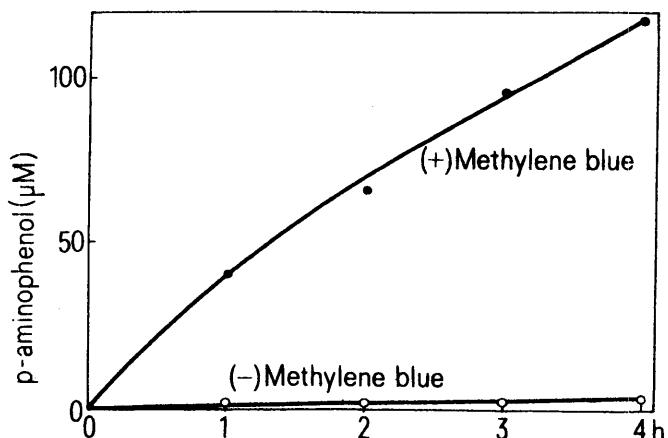


Fig.1 ヒト赤血球によるアニリンの水酸化反応：
[Tomoda et al. Experientia 1977; 33: 1276 より転用]

3. ヘモグロビンの薬物代謝機能について

ヘモグロビンの薬物代謝機能はこれまで断片的ではあるが、報告がいくつもある。MisraとFridovich¹⁷⁾はヘモグロビンの自動酸化過程で放出されるスーパーオキサイドと反応してアドレナリンがアドレノクロムに代謝されることを記載している。Kuhnら¹⁸⁾はヘモグロビンがリポオキシゲナーゼ作用をもち、リノール酸を過酸化物へと代謝することを示した。Tappel¹⁹⁾も同様にヘモグロビンが脂質の過酸化反応に関与することを指摘している。また、ある種の芳香族N,N-ジメチルアミン-N-オキサイドの脱アルキル化²⁰⁾やdopaの脱炭酸反応²¹⁾にヘモグロビンが関与することも報告されている。また、NOがNO₂⁻に代謝されるが²²⁾、これもヘモグロビンの酸化反応と共役している一例といえる。また、ヒト赤血球にはロイコトリエンA₄をロイコトリエンB₄に代謝する機能があることが報告され、この場合ヘモグロビンはロイコトリエンA₄の合成に関与することも併せて示されている²³⁾。

このように薬物の種類は限定されるがヘモグロビンが薬物の代謝機能をもっていることが示されている。

4. ヘモグロビンの酸化還元反応と共に作用した薬物代謝反応

1983年に友田らはヒト赤血球とトリプトファンの代謝物である3-ヒドロキシアントラニル酸とをインキュベートすると、赤血球は急速に茶褐色に変化していくことを観察した¹¹⁾。このこと

は3-ヒドロキシアントラニル酸により赤血球中の二価鉄ヘモグロビンが三価鉄ヘモグロビンであるメトヘモグロビンへ酸化されたことを示している。そこで、3-ヒドロキシアントラニル酸とヒト赤血球とを一定時間インキュベートしたのち、赤血球を溶血して得られる溶血液をセファデックスG-25を充填したカラムに通した(Fig.2)。その結果、カラム内でメトヘモグロビンが明らかに分離された。ところが、それ以外にオレンジ色の色素が高濃度に存在することが明らかとなった。このオレンジ色の色素は分光学的方法、薄層クロマトグラフィ、HPLC、赤外スペクトルなどの分析でシンナバリン酸であることが示された。このことは赤血球中でヘモグロビンの酸化反応のプロセスで3-ヒドロキシアントラニル酸がシンナバリン酸へと代謝されたことを示している。

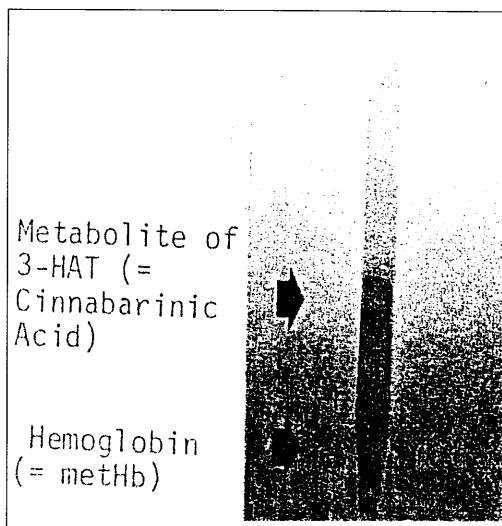
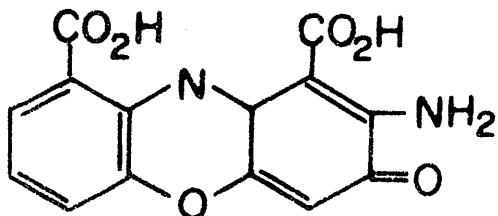


Fig.2 ヒト赤血球における3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAT)によるヘモグロビンの酸化の分析：ヒト赤血球と3ヒドロキシアントラニル酸とを37°Cにて1時間インキュベートしたのち、その溶血液をセファデックスG-25 (fine) を充填したカラムに通した。

Fig.3はシンナバリン酸の化学構造式を示したものである。一般に2つのベンゼン環の間にNとOが挟まれた形の化合物をフェノキサジンといい、シンナバリン酸もフェノキサジンの一種



Cinnabarinic acid

Fig.3 シンナバリン酸の化学構造式

である。

そこでヒト赤血球に3-ヒドロキシアントラニル酸を添加し、37°Cにてインキュベートし、赤血球内のヘモグロビンの酸化反応について経時的に変動を平板ゲル等電点電気泳動法を用いて調べた (Fig.4a,b)。Fig.4aは平板ゲル等電点電気泳動の泳動パターンであり、Fig.4bはそれをゲルスキャンニング法で分析した結果を示す。その結果、赤血球中のオキシヘモグロビンは順次中間体ヘモグロビン $[(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2, (\alpha^{3+}\beta^{2+})_2]$ へ変化し、さらにメトヘモグロビンへと変化していった。しかしながら、60分以降はメトヘモグロビン濃度はほとんど変化していない。このことは生成されたメトヘモグロビンが3-ヒドロキシアントラニル酸により還元され、その反応がヘモグロビンの酸化反応と均衡していることを示唆している (後述)。

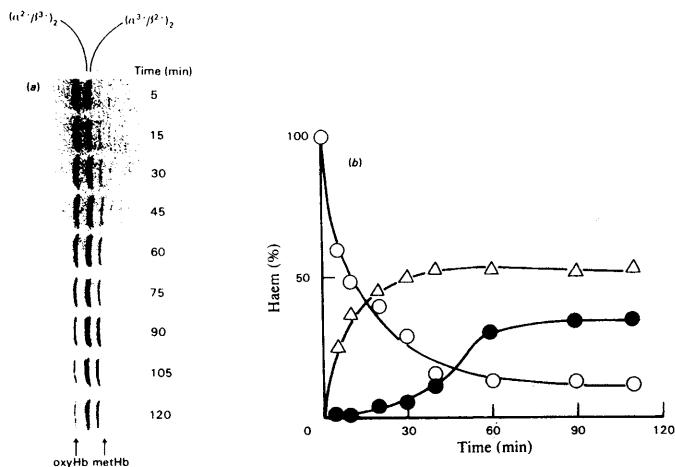


Fig.4 ヒト赤血球における3-ヒドロキシアントラニル酸によるヘモグロビンの酸化反応： a. 平板ゲル等電点電気泳動法による分析 b. ゲルスキャンニングによるオキシヘモグロビン (○)、 中間体ヘモグロビン $[(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2, (\alpha^{3+}\beta^{2+})_2]$ (△)、 メトヘモグロビン (●) の割合 (%) の時間経過

[Tomoda et al. Biochem. J. 1984; 222: 755-60 より転用]

Fig.5a,bは上記条件下で、赤血球内のシンナバリン酸の合成反応を調べた結果を示す。120分以内に赤血球で3-ヒドロキシアントラニル酸はシンナバリン酸(450nmに特徴的な吸収ピークを持つ)へと変化していった (Fig.5a)。Fig.5bはその生成量の時間的変化を示したものである。

これらの結果から、3-ヒドロキシアントラニル酸の赤血球中のヘモグロビンによる代謝はFig.6のように進行すると考えられる。ヘモグロビンの酸化作用により3-ヒドロキシアントラニル酸はオルトキノイミンにまず代謝される。オルトキノイミンは3-ヒドロキシアントラニル酸と縮合反応によりフェノキサジン化合物であるシンナバリン酸へと変わる。

次に3-ヒドロキシアントラニル酸の前駆体である3-ヒドロキシキヌレニンが3-ヒドロキシアントラニル酸同様、アミノ基と水酸基とがオルトの位置にあることから、ヘモグロビンの酸化還元反応と共に進行することが考えられる。Fig.7に示すように、3-ヒドロキシキヌレニンはヘモグロビンの酸化還元反応によりキサントマチンというフェノキサジン化合物に変

化した。キサントマチンはショウジョウバエの眼の色素として知られている。また老人性白内障の水晶体に蓄積する褐色色素がキサントマチンである可能性も示唆されている²⁴⁾。以前より老人性白内障の予防薬として使用されているカタリン(市販名)もキサントマチンである。

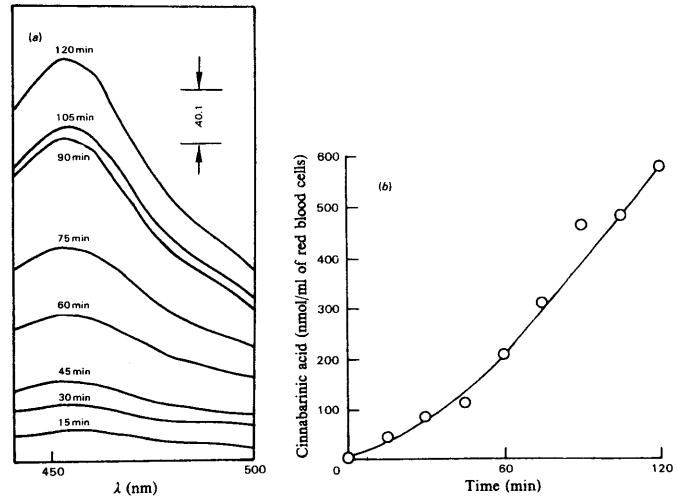


Fig.5 ヒト赤血球におけるシンナバリン酸の生成の時間的経過：
a. ヒト赤血球に3-ヒドロキシアントラニル酸を添加し、37°Cにて2時間インキュベートした。一定時間ごとに試料を採取し、その溶血液をセファデックスG-25(fine)カラムに通してオレンジ色の部分(シンナバリン酸を含む)を回収した。この部分について分光学的方法で解析した
b. ヒト赤血球におけるシンナバリン酸の生成反応の時間的経過

[Tomoda et al. Biochem. J. 1984; 222: 755-60 より転用]

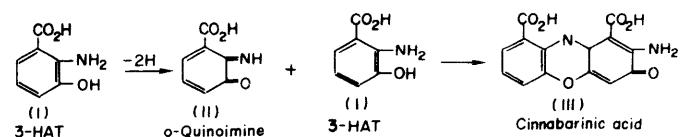


Fig.6 ヒト赤血球におけるシンナバリン酸の生成反応機構

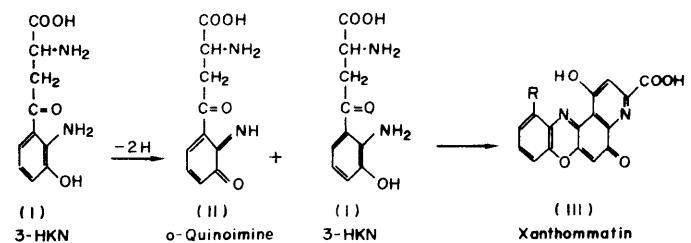


Fig.7 ヒト赤血球におけるキサントマチンの生成反応機構

オルトアミノフェノールはベンゼン環にアミノ基と水酸基とがオルトの位置にある化合物のうち最も簡単なものである。オルトアミノフェノールによるヘモグロビンの酸化還元反応を調べた(図示せず)。その結果、オキシヘモグロビンは急速にメトヘモグロビンへと酸化された。またメトヘモグロビンも還元型ヘモグロビンへと還元された。一方、オルトアミノフェノ-

ル自身はこのようなヘモグロビンの酸化還元反応の間に2-アミノフェノキサジン-3-オンという一種のフェノキサジン化合物へ代謝された。Fig.8は精製したヘモグロビンおよびメトヘモグロビンによるオルトアミノフェノールの2-アミノフェノキサジン-3-オンへの代謝反応を435nmの吸光度の変化で調べたものである。2-アミノフェノキサジン-3-オンはオキシヘモグロビンおよびメトヘモグロビンにより、ほぼ同速度で生成されている。Fig.9はその反応様式を示したものである。

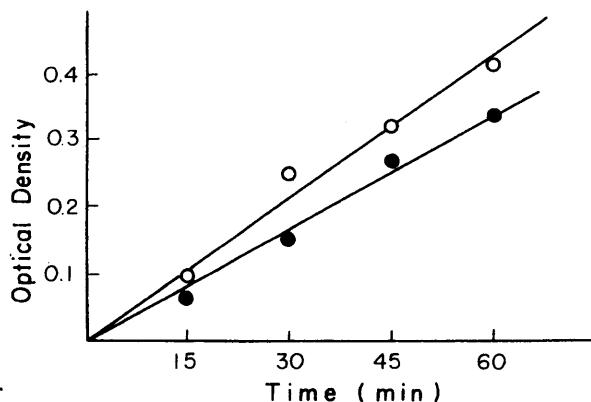


Fig.8 精製ヘモグロビン(オキシヘモグロビン, メトヘモグロビン)による3-ヒドロキシアントラニル酸の代謝反応: シンナバリン酸の生成を450nmにおける吸光度から推定した。
(○) : オキシヘモグロビン (●) : メトヘモグロビン
[Tomoda et al. FEBS Lett. 1986; 196; 44-48 より転用]

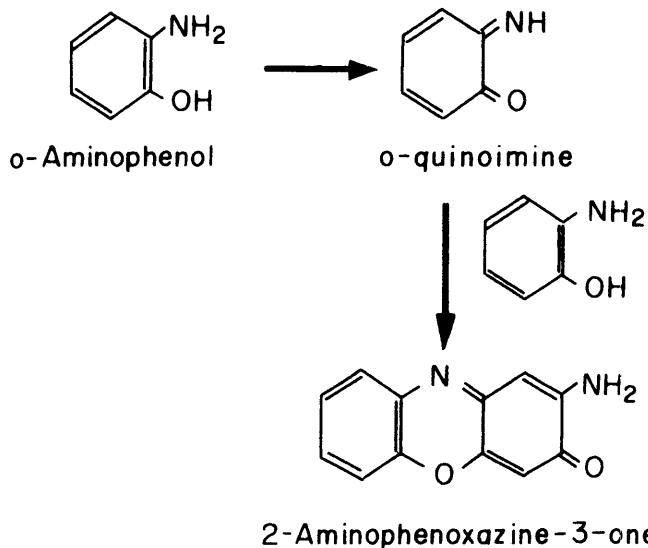


Fig.9 ヘモグロビンによるオルトアミノフェノールの生成反応機構

このようにオルトアミノフェノールの骨格をもった化合物はヘモグロビンを酸化し、還元する作用があり、しかも自分自身はフェノキサジン化合物へと代謝されることが明らかとなった(Fig.2-Fig.9)。

そこで、2-アミノ-4-メチルフェノールおよび2-アミノ-5-メチルフェノールとヘモグロビンとを反応させ、生成されるフェノキサジン化合物を分析すると、各々3-アミノ-1, 4 α -ジハイ

ドロ-4 α , 9-ジメチル-2H-フェノキサジン-2-オンおよび2-アミノ-4, 4 α -ジハイドロ-4 α , 7-ジメチル-3H-フェノキサジン-3-オンという新規のフェノキサジン化合物であることが明らかとなった。Fig.10はヘモグロビンによる2-アミノ-5-メチルフェノールの代謝反応の時間的経過を示したものである。また、その結果生成される2-アミノ-4, 4 α -ジハイドロ-4 α , 7-ジメチル-3H-フェノキサジン-3-オンの化学構造式とその生成反応についてFig.11に示した。これらの化合物は比較的水溶性であり、抗腫瘍作用が強いことが明らかとなってきている²⁵⁻²⁷。抗腫瘍作用の強いアクチノマイシンDの基本骨格がフェノキサジンであることからその作用機構について今後の解明がまたれる。

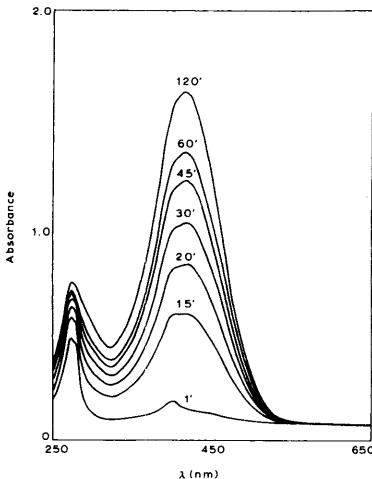


Fig.10 ヒトヘモグロビンと2-アミノ-5-メチルフェノールとの反応過程における吸光度の変化: ヒトヘモグロビンと2-アミノ-5-メチルフェノールとを混合し、2時間37°Cにて反応を行った。一定時間ごとに試料を採取し、セファデックスG-25(fine)を充填したカラムに通した。得られた茶褐色部分の吸光度の変化を調べた。
[Tomoda et al. Biochim.Biophys.Acta 1992; 1117: 306-314より転用]

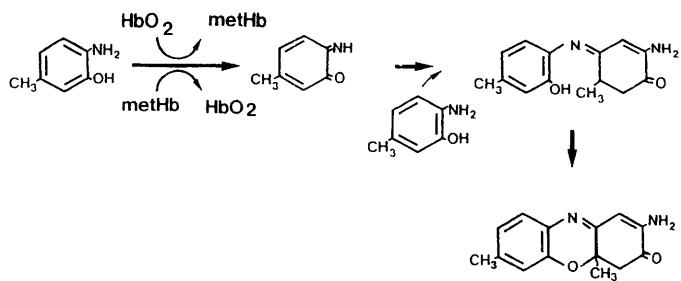


Fig.11 ヘモグロビンおよびメトヘモグロビンによる2-アミノ-5-メチルフェノールの代謝反応機構: 2-アミノ-5-メチルフェノールはオキシヘモグロビンあるいはメトヘモグロビンによってまず、キノイミン型に酸化され、さらにインドフェノールへと代謝され、最終的にフェノキサジンへと変わる。

5. ヘモグロビンの酸化還元作用をもつ化合物によるヘモグロビンの酸化還元反応機構について

従来よりヘモグロビンの酸化反応とメトヘモグロビンの還元反応については詳しく研究が行なわれてきた。しかしながら、二価鉄ヘモグロビンを酸化する化合物のほとんど（フェリシアンカリ、過酸化水素、亜硝酸など）がメトヘモグロビンの還元作用がないことから、ヘモグロビンの酸化および還元作用を併せ持つ化合物については注目されていなかった。しかしながら、友田ら¹¹⁻¹⁵⁾は系統的に検討したところ、ホモゲンチジン酸、オルトアミノフェノールとその誘導体（オルトアミノフェノール、2-アミノ-4-メチルフェノール、2-アミノ-5-メチルフェノール、3-ヒドロキシアントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレン）、L-DOPAなどの芳香族の化合物がヘモグロビンの酸化および還元作用をもっていることが明らかとなった。

Fig.12は3-ヒドロキシアントラニル酸によるヘモグロビンの酸化還元反応を種々の条件下で調べた結果を示す。3-ヒドロキシアントラニル酸の添加により二価鉄ヘモグロビンは速い速度で酸化されたが、この反応はカタラーゼ存在下で抑制され、スーパーオキサイドジスムターゼ存在下で促進された（Fig.12a）。また、この反応は無酸素状態では進行しなかった。一方、メトヘモグロビンの還元反応が3-ヒドロキシアントラニル酸の添加により進行したが、この場合反応速度はスーパーオキサイドジスムターゼ存在下で部分的に抑制された（Fig.12b）。この3-ヒドロキシアントラニル酸によるメトヘモグロビンの還元反応は無酸素状態でも進行した。

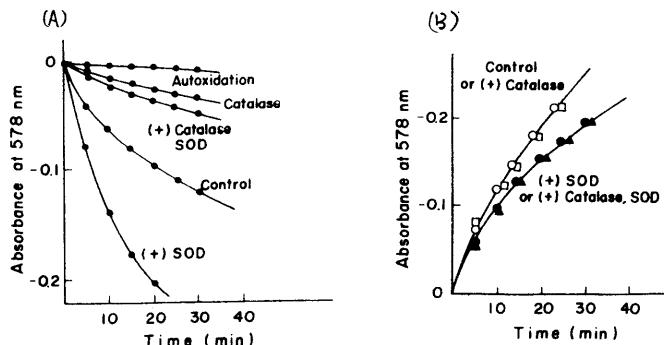


Fig.12 3-ヒドロキシアントラニル酸によるヘモグロビンの酸化還元反応：a. 種々の条件下におけるオキシヘモグロビンの酸化反応 b. 種々の条件下におけるメトヘモグロビンの還元反応 SOD：スーパーオキサイドジスムターゼ [Tomoda et al. Hemoglobin 1986; 10: 33-48 より転用]

Table 1とTable 2はホモゲンチジン酸、オルトアミノフェノール、2-アミノ-4-メチルフェノール、2-アミノ-5-メチルフェノールによるヘモグロビンの酸化反応とメトヘモグロビンの還元反応を種々の条件下で調べたものである。

その結果、これらの化合物を添加するとオキシヘモグロビンはメトヘモグロビンへ酸化され、無酸素状態では反応はまったく進行しなかった（Table 1）。また、オキシヘモグロビンの酸化反応はオルトアミノフェノール、2-アミノ-4-メチルフェノール、2-アミノ-5-メチルフェノールの添加の場合では、カタラーゼやスーパーオキサイドジスムターゼ存在下でも全く影響を受けなかった。しかしながら、ホモゲンチジン酸添加の場合ではオキ

Table 1. Initial rates of oxidation of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin by o-aminophenol, its derivatives and homogentisic acid (μM heme/minute)

Aromatic Compound	Anaerobic	Aerobic				
		Control	P _s -inositol (+)	Catalase (+)	SOD (+)	Catalase + SOD
o-aminophenol	0	1.2	2.0	1.2	1.2	1.2
2-amino-4-methylphenol	0	8.2	11.6	8.2	8.2	8.2
2-amino-5-methylphenol	0	0.18	0.23	0.18	0.18	0.18
homogentisic acid	0	1.96	15.3	0.7	8.2	0.9

Table 1 [Akazawa et al. Tohoku J.Exp.Med. 2001; 192: 301-312 より転用]

Table 2. Initial rates of reduction of methemoglobin by o-aminophenol, its derivatives and homogentisic acid (μM heme/minute)

Aromatic Compound	Anaerobic	Aerobic				
		Control	P _s -inositol (+)	Catalase (+)	SOD (+)	Catalase + SOD
o-aminophenol	0.13	1.6	7	1.6	1.6	1.6
2-amino-4-methylphenol	very slow	1.6	3.5	1.6	1.6	1.6
2-amino-5-methylphenol	0.57	1.45	8.2	1.45	1.45	1.6
homogentisic acid	10	2.5	5.4	2.5	0.7	—

Table 2 [Akazawa et al. Tohoku J. Exp. Med. 2001; 192: 301-312 より転用]

シヘモグロビンの酸化反応はカタラーゼ存在下で非常に抑制され、スーパーオキサイドジスムターゼ存在下では促進された。このようなホモゲンチジン酸によるオキシヘモグロビンの酸化反応の結果は前述の3-ヒドロキシアントラニル酸の場合と一致している。一方、メトヘモグロビンも上記化合物により2価鉄ヘモグロビンへ還元された。この場合、オルトアミノフェノール、2-アミノ-4-メチルフェノール、2-アミノ-5-メチルフェノールによるメトヘモグロビン還元反応はカタラーゼやスーパーオキサイドジスムターゼの作用は全く受けなかったが、ホモゲンチジン酸によるメトヘモグロビン還元反応はスーパーオキサイドジスムターゼにより抑制された。また、これらの化合物によるメトヘモグロビンの還元反応は無酸素状態でも進行した。なお、CarrellとWinterbournはメナジオンにホモゲンチジン酸と同様なメカニズムでヘモグロビンの酸化還元反応を引き起こすことを記載している²⁸⁾。

ホモゲンチジン酸によるオキシヘモグロビンの酸化反応とメトヘモグロビンの還元反応のメカニズムはFig.13のように考えられる（詳細は文献29を参照されたし）。

また、オルトアミノフェノールなどによるオキシヘモグロビンの酸化反応はカタラーゼの影響を受けていないが、その理由としてFig.14のような反応から説明できる。すなわち、オルトアミノフェノール（ED）とオキシヘモグロビンとの反応では1式の反応を経て過酸化水素が生成されると考えられる（2式）。この過酸化水素はヘモグロビンの酸化作用がつよいので、生成された過酸化水素はオキシヘモグロビンの酸化に利用されると考えられる（3式）。それ故、過酸化水素のスカベンジャーであるカタラーゼを反応系に添加すると、反応は阻害されることが予測される。しかしながら、Akazawaらの測定結果（Table 1）³²⁾

ではカタラーゼの影響を全く受けていない。この現象は次のように説明される。Fig.14において、(2)式はカタラーゼによって過酸化水素が消去され反応は右へと促進され結果的にメトヘモグロビンが増加する。ところが、(3)式ではカタラーゼによって過酸化水素が消去されメトヘモグロビンの増加が阻害される。(2)式と(3)式と相殺することで、オルト-アミノフェノールによるヘモグロビンの酸化反応では、カタラーゼによるヘモグロビンの酸化反応への影響が見かけ上見られなかったと考えられる。オルト-アミノフェノール誘導体である2-アミノ-4-メチルフェノールおよび2-アミノ-5-メチルフェノールによるオキシヘモグロビンの酸化反応もカタラーゼの作用が全く見られないことから(Table 1)，この場合も同様な反応機構が推測される。

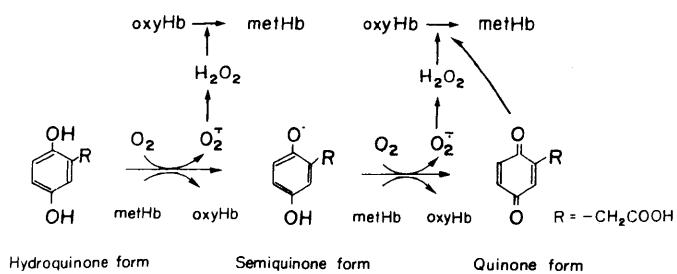


Fig.13 ホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化還元反応機構

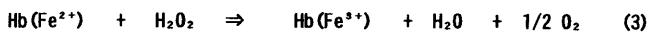


Fig.14 オルト-アミノフェノールによるヘモグロビンの酸化反応機構

6. ヘモグロビンの酸化還元反応と共役した薬物代謝の生理的意義

パラ-アミノフェノール、メタ-アミノフェノールなどは生体内に吸収されると腎臓毒性を示すことがEckertとEyerの研究³⁰⁾で明らかとなっている。一方オルト-アミノフェノールはこのような腎臓毒性を示さない。その理由として、パラ-アミノフェノールやメタ-アミノフェノールはタンパク質変性作用があることが挙げられる。オルト-アミノフェノールはタンパク質変性作用は小さい。しかしながら、それ以外にパラ-アミノフェノールやメタ-アミノフェノールは赤血球中のヘモグロビンによっては代謝されにくいが、オルト-アミノフェノールは赤血球中のヘモグロビンにより急速にフェノキサジン化合物へと代謝されてしまう。ヘモグロビンとの反応で合成されたフェノキサジンは私達が調べたところ、骨髄機能障害はほとんど示さないことがマウスを用いた研究で明かとなり、副作用が非常に低いことが分かつてきた^{25,27)}。

また、ヘモグロビンと反応して出来るフェノキサジン化合物はアクチノマイシンDと類似の化合物であり、アクチノマイシ

ンD同様に強い抗腫瘍作用を示すことが明らかとなってきている。なお、化学合成されたフェノキサジン化合物は水溶性が低く、抗腫瘍作用もほとんど示さない³²⁾。このようなヘモグロビンにより生成されたフェノキサジン化合物の抗腫瘍作用については別の論文に記載する。

オルト-アミノフェノールはヘモグロビンの酸化作用をもつとともにメトヘモグロビンの還元作用も合わせ持つ。このことは、オルト-アミノフェノールが生体内に吸収されると一時的にはメトヘモグロビン血症を引き起こすが、一定時間後にはそれが解除されることを意味する³⁰⁾。昭和20年頃、金沢大学の結核研究所でオルト-アミノフェノールが結核の治療に使用されたことがあった³³⁾。その後、オルト-アミノフェノールと類似の化合物であるPAS(パラアミノサリチル酸)が抗結核剤として世界的に使用されたことを考えると先駆的な研究であったといえる。この場合、患者血液では軽度のメトヘモグロビン血症が起きていた可能性があり、血液中でフェノキサジン化合物(=2-アミノフェノキサジン-3-オン)が生成されていたと考えられる。2-アミノフェノキサジン-3-オンは1957年のAnzaiの報告³⁴⁾で、抗結核作用を示すことが記載されている。

また、Pirie³⁵⁾はトリプトファン溶液に紫外線を照射すると、フェノキサジン類似の化合物が生成され、それが抗生物質作用をもつようになったことを示した。シンナバリン酸はある種の真菌類で合成され、それが抗生物質作用をもつこと、またミトコンドリアの呼吸系抑制作用があることが示されている³⁶⁾。キサントマチンやシンナバリン酸は赤蚕³⁷⁾で大量に合成されていることが示されている。また、シンナバリン酸は膀胱癌患者の腫瘍組織で多量に検出されることから、癌発症と関係していることが推定されている。

以上述べたように、ヘモグロビンの酸化還元反応と共に特定の薬物が代謝され、薬理作用をもつ化合物へと変化することが明らかとなってきた。このような反応は肝臓のチトクロームP450の機能にも匹敵するものであり、血液のもつ解毒機構の1つとして認識されても良いと考えられる。また、ヘモグロビンの機能を有用な薬物の合成に利用できることも示している。

生体を流れる赤血球の総量は重量としては肝臓に匹敵するものであり、また薬物が生体に吸収された場合、肝臓よりも血液の方に先に暴露されることを考えると、赤血球中のヘモグロビンの薬物代謝機能は無視はできないものといえる。

Reference

1. Estabrook RW, Cooper D Y, Rosenthal O. The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. Biochem.Z. 1963; 338: 741-55.
2. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Evidence for its hemoprotein nature. J.Biol. Chem. 1964; 239:2370-8.
3. Coon MJ, van der Hoeven TA, Haugen DA, Guengerich FP, Vermilion JL, Ballow DP. Biochemical characterization of highly purified cytochrome P-450 and other components of

- the mixed function oxidase system of liver microsomal membranes. in Advances in Experimental Medicine and Biology (Ed. DY Cooper, Plenum Press, New York) 1975; 58: 25-46.
4. Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin function. in Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects (W.B.Saunders Company, Philadelphia) 1986; 37-60.
 5. Armstrong JM, Myers DV, Verpoorte JA, Edsall JT. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *J.Biol.Chem.* 1966; 241:5137-49.
 6. 今井清博. ヘモグロビンの構造と機能. *生物物理* 1978; 18: 20-43.
 7. 浜崎直孝. 赤血球中の血色素. *蛋白質・核酸・酵素* 1987;32: 94-100.
 8. Mieyal JJ, Ackerman RS, Blumer JL, Freeman LS. Characterization of enzyme-like activity of human hemoglobin; properties of the hemoglobin-P-450 reductase-coupled aniline hydroxylase system. *J. Biol. Chem.* 1976; 251: 3436-41.
 9. Mieyal JJ, Blumer JL. Acceleration of the autoxidation of human oxyhemoglobin by aniline and its relation to hemoglobin-catalyzed aniline hydroxylation. *J.Biol.Chem.* 1976; 251: 3442-6.
 10. Carrell R, Winterbourn CC. Hemoglobin-a frustrated oxidase? Implications for red cell metabolism. *Hemoglobin* 1977; 1: 815-27.
 11. Tomoda A, Shirasawa E, Yoneyama Y. Reactions of oxy- and methemoglobin with tryptophan metabolites, 3-hydroxyanthranilic acid and 3-hydroxykynurenone. *Hemoglobin* 1986; 10:33-48.
 12. Tomoda A, Shirasawa E, Nagao S, Minami M, Yoneyama Y. Involvement of oxidoreductive reactions of intracellular haemoglobin in the metabolism of 3-hydroxyanthranilic acid in human erythrocytes. *Biochem.J.* 1984; 222: 755-60.
 13. Tomoda A, Yamaguchi J, Kojima H, Amemiya H, Yoneyama Y. Mechanism of o-aminophenol metabolism in human erythrocytes. *FEBS Lett.* 1986; 196:44-8.
 14. Tomoda A, Arisawa M, Koshimura S: Oxidative condensation of 2-amino-4-methylphenol to dihydrophenoxazinone compound by human hemoglobin. *J.Biochem.* 1991; 110: 1004-7.
 15. Tomoda A, Hamashima H, Arisawa M, Kikuchi T, Tezuka Y, Koshimura S. Phenoxazinone synthesis by human hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1117: 306-14.
 16. Tomoda A, Yubisui T, Ida M, Kawachi N, Yoneyama Y. Aniline hydroxylation in the human red cells. *Experientia* 1977; 33: 1276-7.
 17. Misra H, Fridovich J. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J.Biol.Chem.* 1972; 247: 6960-6962.
 18. Kuhn H, Gotze R, Schewe T, and Rapoport S M. Quasi-lipoxygenase activity of haemoglobin. *Eur.J.Biochem.* 1981; 120: 161-8.
 19. Tappel AL. The mechanism of the oxidation of unsaturated fatty acids catalyzed by hematin compounds. *Arch.Biochem. Biophys.* 1953; 44:378-95.
 20. Kiese M, Renner G, Schlaeger R. Mechanism of the autocatalytic formation of ferrihemoglobin by N,N-dimethylaniline-N-oxide. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv. Exp. Pathol. Pharmakol.* 1971; 268:247-63.
 21. Yamabe H, Lovenberg W. Decarbonylation of 3,4-dihydrophenylalanine by oxyhemoglobin. *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 1972; 47: 733-9.
 22. Kiese M. Ferrihemoglobinemia caused by foreign compounds. in *Methemoglobinemia: A comprehensive treatise* (CRC press, Cleveland, U.S.A) 1974; 60-8.
 23. Fitzpatrick F, Liggett W, Mcgee J, Bunting S, Morton D, Samuelsson B. Metabolism of leukotriene A4 by human erythrocytes. A novel cellular source of leukotriene B4. *J. Biol.Chem.* 1984; 259: 11403-7.
 24. Tomoda A, Yoneyama Y, Yamaguchi T, Shirao E, Kawasaki K. Mechanism of coloration of human lenses induced by near-ultraviolet-photo-oxidized 3-hydroxykynurenine. *Ophthal. Res.* 1990; 22: 152-9.
 25. Mori H, Honda K, Ishida R, Nohira T, Tomoda A. Antitumor activity of 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α ,7-dimethyl-3-H-phenoxyazine-3-one against Meth A tumor transplanted into BALB/C mice. *Anti-Cancer Drugs* 2000; 11: 653-7.
 26. Ishida R, Yamanaka S, Kawai H, Ito H, Tomoda A. Antitumor activity of 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α ,7-dimethyl-3-H-phenoxyazine-3-one, a novel phenoxyazine derivative produced by the reaction of 2-amino-5-methylphenol with bovine hemolysate. *Anti-Cancer Drugs* 1996; 7: 591-5.
 27. Shimamoto T, Tomoda A, Ishida R, Ohyashiki K. Antitumor effects of a novel phenoxyazine derivative on human leukemia cell lines in vitro and in vivo. *Clin.Cancer Res.* 2001; 7 (in press)
 28. Winterbourn CC, French JK, Claridge RFC. The reaction of menadione with haemoglobin: Mechanism and effect of superoxide dismutase. *Biochem.J.* 1979; 179:665-73.
 29. 米田陽一, 小泉純子, 赤沢麻美, 高崎優, 山口順道, 友田燁夫. ホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化還元反応と修飾反応. *人工血液* 2000; 8: 13-20.
 30. Eckert KG, Eyer P. Differences in the reactions of isomeric ortho- and para-aminophenols with hemoglobin. *Biochem. Pharmacol.* 1983; 32: 1019-27.
 31. Motohashi N. Test for antitumor activities of phenothiazines and phenoxyazines (in Japanese). *Yakugaku Zasshi* 1983; 103: 364-71.
 32. Akazawa M, Takasaki M, Tomoda A. Oscillatory oxido-reductive reaction of intracellular hemoglobin in human

- erythrocyte incubated with *o*-aminophenol. *Tohoku J. Exp. Med.* 2001; 192: 301-12.
33. 越村三郎, 林栄一. 結核化学療法の基礎的研究(第8報) : *o*-aminophenol, sulfanilamid-並に4,4'-dioxydiphenylsulfone型誘導体の結核菌に対する試験管内消毒作用に就いての検索. *金沢結研年報* 1945; 4: 95-102.
34. Anzai K, Isono K, Okuma K, Suzuki S. The new antibiotics, Questiomycins A and B. *J.Antibiotics.* 1959; Ser.A XIII; 125-31.
35. Pirie A. Formation of N'-formylkynurenine in proteins from lens and other sources by exposure to sunlight. *Biochem.J.* 1971; 125: 203-8.
36. Zollner H. Effects of cinnabarinic acid on mitochondrial respiration. *Biochem.Pharmacol.* 1976; 25: 643-8.
37. Ogawa H, Nagamura H, Ishiguro I. Cinnabarinate formation in Malpighian tubules of the silkworm, *Bombyx mori*: reaction mechanism of cinnabarinate formation in the presence of catalase and manganese ions. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem.* 1983; 364:1507-18.

原著

NRC(Neo Red Cell: 血液代替物)による高度血液交換モデルの免疫能 Study on immune state of high grade blood exchange using NRC in rats

柳田尚之, 川村明夫, 田中三津子, 玉置透, 米川元樹

Naoyuki Yanagida, Akio Kawamura, Mitsuko Tanaka, Tohru Tamaki, Motoki Yonekawa

和文抄録

重症免疫性疾患の治療、異種移植における超急性拒絶を避けるために全血液交換（トータル・ボディー・リンス）を行うと云うアイデアがある。しかし、臨床の場で人の全血を交換することは副作用の上から実施は困難である。そこで、著者らはNRC(Neo Red Cell)をもちいて高度血液交換モデルを作製した。動物は雄性ラットをもちい血液交換率は83.5%であった。このモデルの免疫能は補体活性が血液交換後ほぼ0になった。また、リンパ球は数時間後に40%減少した。いっぽう、好中球はむしろ7～8倍に増加した。免疫グロブリンも著しく減少した。これは血液交換モデルがほぼヌード・マウスと同じ状態になったことを示している。すなわち、NRCをもちいた高度血液交換が異種移植の急性拒絶防止、高度免疫異常疾患の治療に役立つことを示した。

Abstract

We are recognizing that total body rinse (total blood exchange) is an idea to treat severe immune diseases and to protect hyper acute rejection in xeno-transplantation. But, total blood exchange has not been experimented clinically, because of anxiety that is severe side effects. Therefore, we made a high grade blood exchange model with NRC (Neo Red Cell) in rats and studied about their immune state. The exchange rate was 83.5% (mean). After blood exchange, complements were decreased to level 0. Lymphocyte counts were decreased to 40% of the control after blood exchange. However, neutrophils were increased to 7-8 times. Immune proteins were markedly decreased. Their immune state like as a nude mouse. These findings suggest that a high grade blood exchange with NRC is useful to treat severe immune diseases and to protect hyper acute rejection in xeno-transplantation.

Keywords

neo red cell (NRC), total body rinse, total blood exchange, immune disease, xeno-transplantation

1. 目的

現在、自己免疫疾患をはじめとする免疫異常による疾患の治療にはステロイドホルモン、免疫抑制剤のイムランなどが主に用いられている¹⁾。また、体外免疫調節では標準的血漿交換、血液交換、二重血漿濾過、血漿冷却濾過、免疫吸着、さらに白血球除去療法などがおこなわれている。しかし、高度の免疫異常による疾患にこれらの方針だけで充分とは云いがたい。そこで、全血液交換なども理論上は考えられているが人どうしの血液で全交換すると副作用も強く懸念される。

一方、臓器移植の世界ではドナー不足は深刻である。トランジジェニックの異種動物臓器を移植に応用する道も容易であるようにみえたが、実現にあたってのハードルはまだまだ残されている。

そこで我々は重度免疫疾患の治療として、また異種臓器移植で超急性拒絶がNRCによる高度血液交換でコントロールすることの可能性を推測するために高度血液交換モデルの免疫能を検討した。

2. 実験方法

a. 動物

高度血液交換をおこなう動物には外部から購入し我々の研究所で充分に観察、コントロールされた正常雄性：BN系ラット、体重190-290gを使用した。

b. Neo Red Cell

テルモから供給されたNRC (NRC濃度7%とし、5%bovine serum albuminを加えて浸透圧が300-31mOsm/KgH₂Oになるように調整されたもの) を用いた。このNRCは期限切れ濃厚赤血球から調製したストローマフリーへモグロビンをリポソームにカプセル化した人工酸素運搬体である。

c. 高度血液交換モデルの作成

BN系雄性ラットを酸素投与下にエーテル麻酔した。頸部動脈を露出し、カニュレーションを行った。カニューレにはシリコンラバーカテーテルを用いた。頸動脈から15-30秒かけて1.5 mlの動脈血を脱血し、頸静脈からNRC1.7mlを注入した。操作は3分間のインターバルを置いて10-13回繰り返した。血液交換はヘマトクリット値による血液交換率85%を目標にした。交換後は頸静脈から1時間1mlでNRCの輸注を行った。(Fig. 1)

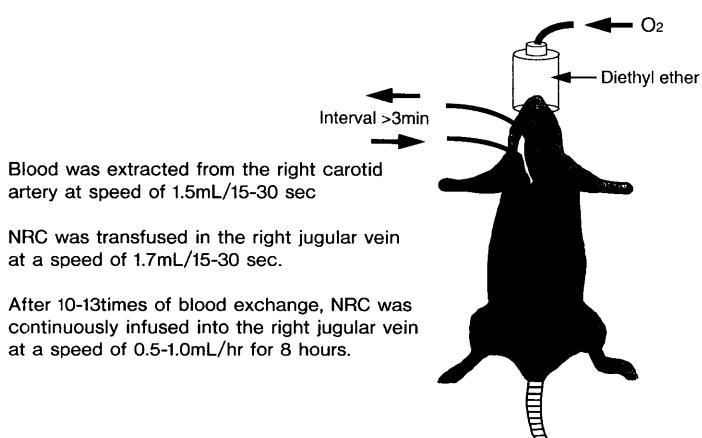


Figure 1

d. 測定

血液一般（赤血球数、白血球数、血小板数、ヘマトクリット値）、リンパ球数、好中球数、液性免疫能（C3、CH50）の測定をおこなった。また、ヘマトクリット値による血液交換率は、(交換前Hct - 交換後Hct) / 交換前Hct × 100 (%) で算出した。リンパ球、好中球、液性免疫の検査では頻回の採血に動物が耐えられないので、血液交換前、後、4時間後を一群としたり、16、24時間後群を一群とした。詳細は結果の項で示す。

3. 結果

a. 血液交換後の赤血球数、血小板数、Hctの変動

$n=6$ で168時間まで観察された。詳細は人工血液5:14, 1997²⁾を参照されたい。赤血球は $801.3 \pm 44.1 (\times 10/\mu\text{L})$ が 128.8 ± 25.9 へ、血小板は $86.0 \pm 5.4 (\times 10/\mu\text{L})$ は 35.0 ± 17.5 、ヘマトクリット値(%)は 43.5 ± 1.9 が 7.1 ± 1.5 まで低下した。すなわち、ヘマトクリットによる交換率(%)は 83.5 ± 3.8 であった。

b. リンパ球数

血液交換前と後のnは10である。単位は白血球数に対する%である。交換前のリンパ球数は平均 86.5 ± 6.48 (%), 交換直後は 86.3 ± 6.53 で両者は差は認められない。血液交換4時間後のリンパ球数は 49.0 ± 18.48 ($n=5$) で有意に減少している。また、16時間後では 62.0 ± 13.50 ($n=5$) と4時間後値より増加した(Fig. 2)。

c. 好中球数

NRC交換前の好中球数は 6.12 ± 6.45 (%) ($n=10$), 直後 ($n=10$) は 9.4 ± 4.67 であった。しかし、4時間後では 48.2 ± 17.88 ($n=5$) と増加を示し、この傾向は16時間後でも 33.4 ± 14.89 ($n=5$) と持続した(Fig. 2)。

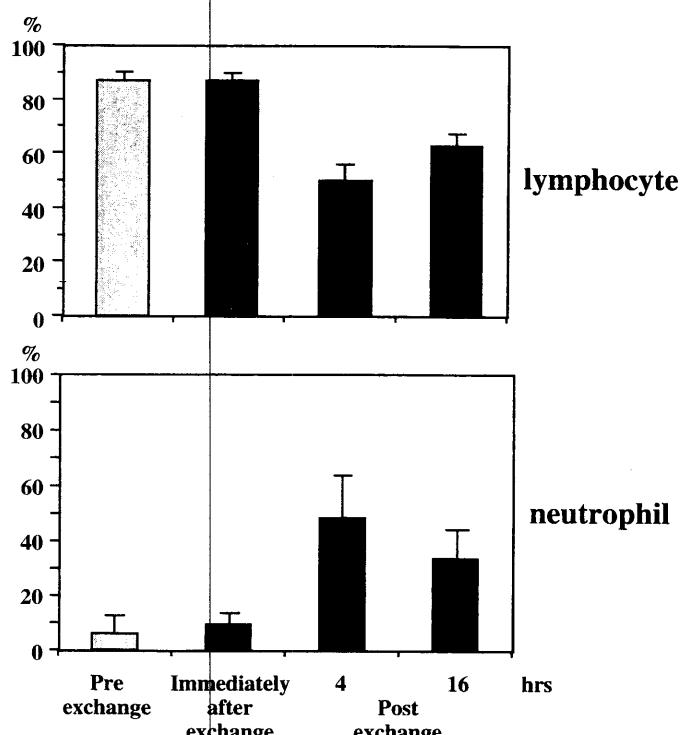


Figure 2

d. IgGとIgM

血液交換前のIgG値は 252.15 ± 68.98 (mg/dl) ($n = 8$)、血液交換直後は 30.75 ± 10.12 、4時間後は 34.75 ± 9.94 となった。また、IgMの血液交換前値は 32.25 ± 11.16 (mg/dl) ($n = 8$) であるが、血液交換後は全てのサンプルで直後、4時間後値が測定可能値以下、すなわち <8mg/dl となつた(Fig. 3)。

e. C3の変化

交換前のC3の平均は 79.38 ± 21.67 (%) ($n = 8$) で交換直後には25%以下と激減した ($n = 8$)。また、交換4時間以降も検出限界値を下回った(Table 1)。

f. CH50の変化

血液交換前のCH50は 29.31 ± 7.98 (unit/ml) ($n = 8$) で交換直後、4時間後ではいずれも10unit/mlの検出限界値以下になつた(Table 1)。

g. ACH50

血液交換前のACH50は 68.38 ± 23.70 (unit/ml)(n = 8)であったが、これもC3, CH50と同様に血液交換後は検出限界値以下になった(Table 1).

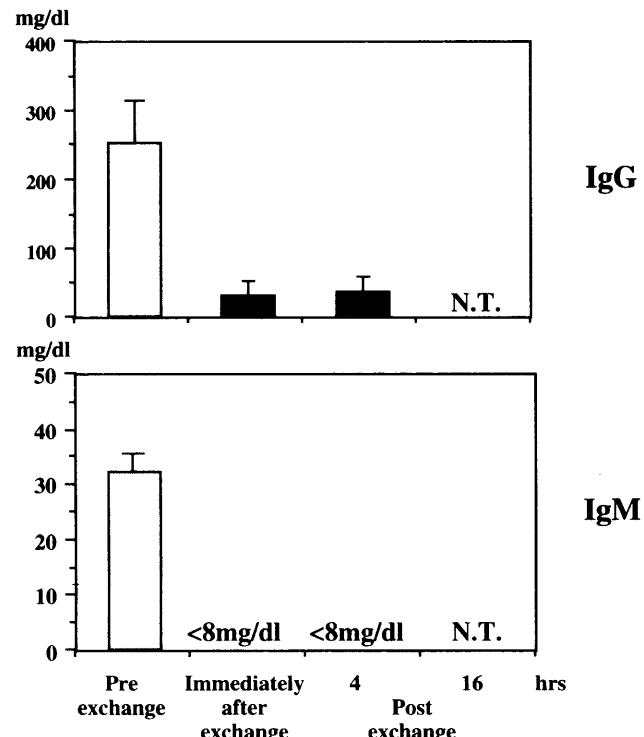


Figure 3

Table 1 Change of compliments

	C3 (%)		CH50 (unit/ml)		ACH50 (unit/ml)		
	pre	blood exchange	post	pre	post	pre	post
4-1	88		<25	30.1	<10.0	88.8	<25.0
4-2	76		<25	32.7	<10.0	57.5	<25.0
4-3	101		<25	34.2	<10.0	81.7	<25.0
4-4	81		<25	33.7	<10.0	72.5	<25.0
4-5	94		<25	32.5	<10.0	102.4	<25.0
4-6	42		<25	<10.0	<10.0	<25.0	<25.0
4-7	53		<25	29.5	<10.0	57.6	<25.0
4-8	100		<25	31.8	<10.0	61.5	<25.0

4. 考察

異種動物間の臓器移植は大きな困難がある。その第一に超急性拒絶反応があげられる。この超急性拒絶反応を制御できれば異種臓器移植にも展望が開ける。そこで我々はラットにモルモットの心臓を異所的に移植し、これを生着させる条件として、レシピエントすなわちラットの免疫系を何らかの方法で制御し、超急性拒絶反応を回避しようと試みている。

さて、この研究ではラットの血液を血液代替物（人工血液）

で置換して、ラットの細胞性、液性免疫能を極度に低下させうるかを検討した。すなわち、重度の免疫異常による疾患のコントロールや異種移植の可能性を検討したものである。

まずリンパ球の変化を検討すると、高度血液交換にもかかわらず前後でカウント数に変化がない。これは血液が交換され、血中のリンパ球は一時的に減少するが、生体の防御反応として、リンパ球の再循環がすみやかにおこり血液中に補給されたのであろう。しかし、4時間、16時間後では前値の57%，71%に減少している。すなわち、再循環のプールがなくなりリンパ球除去療法をおこなったのと同じ状態になっている³⁾。

つぎに骨髄細胞系のリンパ球の動態をみると、リンパ球は血液交換直後にわずかに増加する傾向にあるが、有意ではない。しかし、4時間に7.8倍、16時間後でも5.5倍と増加している。この現象を免疫の面からとらえると、貪食や抗原抗体複合蛋白の取り込み能力が増強されている。すなわち免疫複合物質の増加による免疫性疾患の病状改善や臓器移植の際の免疫反応（拒絶）の抑制に働くものと考えられる。

いっぽう、免疫グロブリンの動向をみるとIgG,IgMとともに血液交換後には測定限界値を下回る量となる。生体から免疫グロブリンがほぼなくなったと解して良い。とくに、IgMの消失状態は異種移植の際、移植片の超急性拒絶を防ぐことが出来ると考えられる。すなわち、同種移植でもABO型血液不適合移植の場合、レシピエントのIgMを吸着やフィルターで取り除き、拒絶を制御する⁴⁾のと同一に考えられる。もちろん同種間の移植であればIgMの除去で事たりるが、異種移植の場合には高度血液交換のような方法が要求されよう。

高度血液交換モデルの補体活性はこれも、血液交換後にはほぼ消失する。通常、補体の活性化は免疫複合体（古典的経路）や細菌により起動される第二経路をへて共通経路にいたる。特に、古典的経路はIgM,IgG1,IgG2,IgG3により活性化されるが、高度血液交換ではこれら免疫蛋白が極端に減少すること、血液交換により補体蛋白そのものが減少することにより生体の免疫応答は極度に低下する。C3,CH50,ACH50の測定限界値を下回る結果はこの間の状況を示している。

NRCによる高度血液交換により生体の免疫能は極度に低下する。もちろんこの様な状態が通常の生体にとって利益のあることではない。しかし、異種移植片の急性拒絶を回避し、生着させるためには宿主免疫能を極端に抑制する必要がある。また、高度免疫異常により引き起こされた抗原抗体反応とそれに続く大量の細胞破壊を抑制するには、このような極端な免疫能の抑制が必要になる。例えば、悪性関節リュウマチ、重症多発性筋炎、重症大動脈症候群、重症SLEなどに血漿交換療法、血漿二重濾過、血漿冷却濾過などをおこなうが、これらの治療法だけで救命は難しい⁵⁾。そこで、トータル・ボディー・リソスという概念が必要になる。そして、この概念に最も近いのが血漿交換である。しかし、徹底的な血液の置換をおこなうために大量の血漿交換をおこなうことは、むしろアナフィラキシー・ショックなどの致命的な副作用が懸念され、実施されることはない。すなわち、この様な状況からもNRCの一層の開発と製品化が強く望まれる。

5. 結論

NRCによる高度血液交換は免疫調節に重要な役割をはたすであろう。一つには異種移植の道を開き、二つには重度免疫障害疾患の救命率を著しく高める可能性がある。すなわち、トータル・ボディー・リンスの概念が実用のものとなる。

参考文献

1. 川村明夫, 米川元樹, 目黒順一. 自己免疫疾患急性増悪例に対する血液浄化法. 救急医学1993; 17: 193-7.
2. 柳田尚之, 玉置透, 川村明夫, 石崎彰, 岡野正裕, 高橋昌宏, 田中三津子, 目黒順一, 久木田和丘, 米川元樹, 緒方嘉貴, 福井秀男. Neo Red Cell (NRC) によるラット高度血液交換モデルの確立. 人工血液1997; 5: 14-7.
3. Kawamura A, Saitoh M, Yonekawa M, Horie T, Ohizumi H, Tamaki T, Kukita K, Meguro J. New technique of leukocyteapheresis by the use of nonwoven polyester fiber filter for inflammatory bowel disease. Therapeutic Apheresis 1999; 3: 334-7.
4. Kawamura A, Osanai M, Yonekawa M. Immunomodulation in transplant patients by cryofiltration. Therapeutic Apheresis 1998; 2: 205-9.
5. Kawamura A, Yonekawa M, Kukita K, Meguro J, Witmanowski H, Kamii N, Takahashi M, Onodera K. Clinical application of cryofiltration. Artificial Organs Today 1992; 2: 159-76.

The Journal of Trauma. 2001;50:449-456.

血液代替物による蘇生は外傷後の好中球による病的細胞障害を抑制する

Resuscitation with a Blood Substitute Abrogates Pathologic Postinjury Neutrophil Cytotoxic Function

Jeffrey L. Johnson, MD, Ernest E. Moore, MD, David A. Partrick, MD, Douglas Y. Tamura, MD,
Garret Zallen, MD, and Christopher C. Silliman, MD, PhD

Department of Surgery, Denver Health Medical Center, and the Bonfils Blood Center
and the Department of Pediatrics, University of Colorado Health Science Center, Denver, Colorado.

渡辺真純
Masazumi Watanabe

要約

外傷による出血性ショック患者では蘇生液としての酸素運搬体投与がきわめて重要である。しかし、保存された赤血球濃厚液中の生物学的メディエーターは循環血液中の好中球を活性化し、外傷後早期のhyperinflammationや多臓器不全(MOF)を悪化させる可能性がある。これに対して、ヘモグロビン由來の血液代替物(Poly-Heme)はこうしたメディエーターを含まないとされているが、このPoly-Heme投与による患者蘇生が好中球のプライミングを抑制するか否かを検証することがこの研究の目的である。

Materials and Methods

緊急の輸血が必要と予想される18歳以上の外傷患者を対象とした。これまでの解析から12時間以内に6単位以上の赤血球濃厚液(PRBCs)投与が予想されるInjury Severity Score(ISS)15以上の症例を選び、PRBCsまたはPoly-Hemeを投与した。Poly-Heme(Northfield Laboratories, Evanston, IL)はpolymerized pyridoxylated hemoglobinである。Poly-Hemeの投与上限は20単位(ヘモグロビン1000gに相当)とした。晶質液投与に抵抗する低血圧、ヘモグロビン7g/dL以下の貧血に際してPRBCsまたはPoly-Hemeを投与した。Poly-Heme群でも必要に応じてPRBCsを投与した。臨床的パラメーターとして血圧、心拍数、pH、輸血単位数、年齢、ISSを観察した。

受傷直後(baseline)、3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 120時間後にそれぞれヘパリン化全血採血を行い、患者好中球における

以下の項目を測定した。

- 1) フローサイトメトリー法による β -2 integrineのサブユニットであるCD11bおよびCD18の発現。同時にplatelet-activating factor(PAF)刺激によるCD11bおよびCD18の発現。
- 2) fMLP刺激によるsuperoxide anionの放出
- 3) fMLP刺激によるelastaseの放出

Results

PRBCs群10例、Poly-Heme群9例がエントリーされた。両群の年齢、ISS、24時間以内の最低pH値、最小血圧、ヘモグロビン投与単位に差はなかった。Poly-Heme群5例では最初の12時間にPRBCsは投与されなかった。Poly-Heme群は全例生存したが、PRBCs群10例中3例(30%)が後期のMOFにより死亡した。

- 1) CD11bおよびCD18

好中球のCD11b発現は受傷3, 6, 12, 24, 36時間後にPRBCs群ではPoly-Heme群に比較して有意に上昇していた。CD18の発現も同様であった。一方、PAF刺激によるCD11bおよびCD18の発現はPoly-Heme群で増強しており、同群での β -2 integrineの発現能は保持されていた。

- 2) superoxide anion

fMLP刺激によるsuperoxide anionの放出はPRBCs群で受傷6, 12時間後に増加していたがPoly-Heme群では変化しなかった。

- 3) elastase

fMLP刺激によるelastaseの放出はPRBCs群で受傷24, 36, 72

時間後に増加していたが、Poly-Heme群では変化しなかった。

Discussion

外傷後早期の血液代替物使用は好中球の活性化を惹起しないため、MOFの発生、重症化を抑える事ができると考えられる。現在、大規模な臨床研究をスタートさせており、PRBCs群およびPoly-Heme群における免疫担当細胞の機能、サイトカイン、末梢臓器障害のマーカー、生存率、感染性の副作用などについて検討する予定である。こうした知見を通じて血液代替物の使用拡大や従来の血液保存法の見直しが行われれば、外傷患者の治療に有益であろう。

訳者のコメント

外傷性出血患者に対する赤血球代替物（polymerized hemoglobin）投与のclinical studyであるが、polymerized hemoglobinが赤血球濃厚液との比較で従来の赤血球輸血が持つ好中球に対する

細胞障害能を誘導しないことを示した大変興味深い論文である。外傷症例の臨床で赤血球濃厚液投与例とpolymerized hemoglobin投与例で好中球の β -2 integrine発現、superoxide anion、elastase放出を測定し、いずれもpolymerized hemoglobin投与群でこれらが抑制されていることが示されている。これまでに人工酸素運搬体を投与した臨床例でのこうした検討は見あたらず、通常の輸血に伴うこうした副作用が血液代替物の投与では生じにくいことが示され、大変画期的と考えられる。

症例数はそれぞれ10例程度と少數であるが、赤血球濃厚液投与例ではMOFによる3例の死亡があったが、polymerized hemoglobin投与例では全例が生存していることが示されている。

今後は症例を重ねて、2群における臨床像の違い（ARDS発症の有無や、臨床検査データ）についてさらなる解析がなされることを期待する。また、好中球を活性化する赤血球濃厚液中のメディエイターについての知見が得られ、同定されれば臨床に大きなメリットとなるであろう。

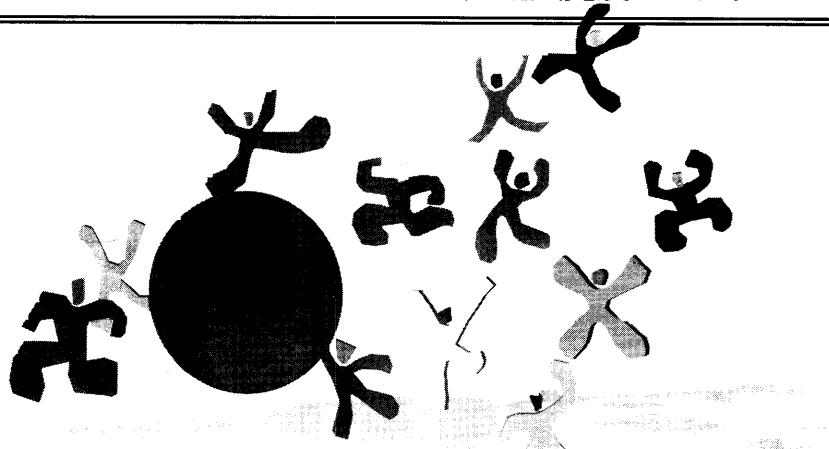
静注用人免疫グロブリン製剤

薬価基準収載

指定医薬品

献血グロベニン®-I-ニチヤリ

〈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、添付文書をご参考ください。

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

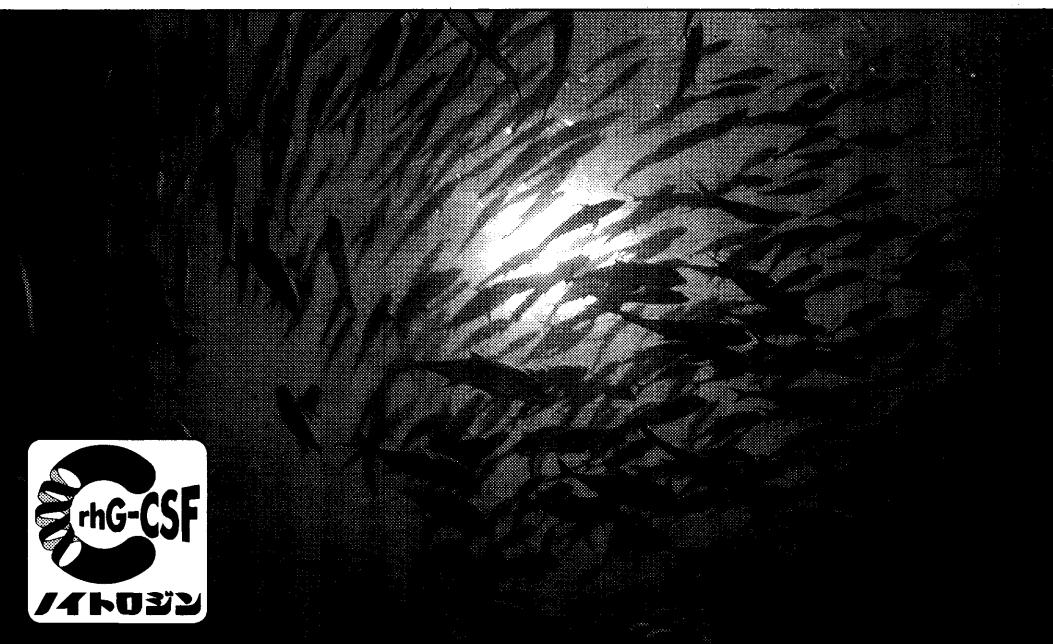
2000年10月作成(K)

●編集後記●

新しく編集委員に加えて頂くことになりました。学生時代に読んだ酸素運搬体としてのペーフルオロカーボンエマルジョンに関する論文を読み返してみると、まだまだ不十分だった乳化技術と乳化材料にも関わらず、すばらしい研究がなされたことに改めて敬意を感じます。現在の乳化技術や乳化材料が十分というわけではありませんが、当時に比べかなりの進歩がありました。新規の乳化技術の開発に微力ながら関わった経緯から、数

年前よりペーフルオロカーボンエマルジョンの研究に参入しましたが、アライアンス社を中心として適応を絞った臨床治験が欧米で進んでいる中、研究の展開をいかにするべきか悩みつつ、日本オリジナルの製剤を目指して研究したいと思います。この研究を通じ、また編集委員として学会の発展に役に立てればと考えております。よろしくお願ひ致します。

(福島昭二)



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

ノイトロジン

NEUTROGIN^{Injection}

一般名 レノグラスマム(遺伝子組換え)

®
注
50 μ g
100 μ g
250 μ 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®
 ■健保適用



●ご使用に際しましては製品添付文書をご参考下さい。

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

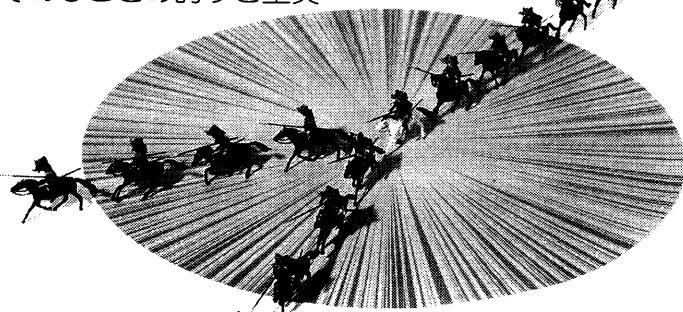
製造元・販売
化血研
 熊本市大通1-6-1 〒860-8568

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
 BO11T9810 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

〈乾燥スルホ化人免疫グロブリン〉
 生物学的製剤基準

献血ベニロン-I

Kenketsu Venilon®-I

薬価基準収載

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、感染症関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」の項参照) ●ご使用に際しましては、製品添付文書をご参考下さい。

総発売元・販売

製造元・販売

資料請求先：帝人(株)医薬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：帝人株医薬事業本部学術情報部



日本化学会及血清療法研究所
 熊本市大通1-6-1 〒860-8568
 090-945-12151 090-945-1345
 資料請求先：(財)化学及血清療法研究所営業管理部

VE 16-9908 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こと。
- 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²⁾, ³⁻⁵⁾, ¹⁾, ⁴⁻⁶⁾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。ただし、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。

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、福島昭二、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 (2) 2001年7月16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