

侵入し、Hbの代謝亢進によるbilirubin排泄の亢進、またCOが血中Hbに捕捉され、20%の血管抵抗の増大を示し、同時に類洞の不連続的狭小化と流動停止領域が確認されている。他方でセル型のHb小胞体では粒径が0.2 μmと大きくDisse腔に侵入できないため、急激な代謝とCO捕捉は起こらない。

■全合成系の酸素輸液

1. パーフルオロカーボン乳液を用いる酸素輸液
perfluorocarbonは酸素分圧に比例した酸素溶解度を示し、160 mmHgで40~50vol%の酸素を溶解する。これ自体水に不溶であるが、界面活性剤で懸濁させた分散水溶液（白色ミルク様外観）である。ミドリ十字社のFluosol-DA 20 (20% Perfluorodecalin)はこれで、FDAの認可(1990)も受けている^{30,31)}。しかし、用途が経皮経管冠動脈拡張術後の灌流に制限され、実質的に溶液の酸素溶解度も低いこと、滞留時間が短いこと、形態の安定度が低い、細網内皮系へ大量捕捉される、補体活性、肺表面活性物質への影響、蓄積性、投与までの準備の煩雑さの問題のため、あまり使用されることなく1993年には生産を停止した。Fluosol-DAの酸素溶解度が低いのは、perfluorocarbon分散量に限界があるためである。さらに、粒子が不安定で径が大きいため、効率よく肺で酸素化しないこと、また粒子を小さくしようとして各種界面活性剤も検討されたが、肺表面活性物質の活動に異常をきたし、肺膨張あるいは肺水腫を起こす場合もみられ問題を残している。

その後、最近になってアメリカベンチャー開発の第二世代perfluorocarbon系ともいべき対象は粒子径も小さく、また濃度も高められ、総じて酸素溶解量が高くなっている。小粒径は同時に血中滞留時間の延長にも有効である。Fluosol-DAが界面活性剤におもに水溶性高分子Pluronicを用い、全体的なperfluorocarbon濃度が低かったが、これらの例ではリン脂質濃度を高めてFluosolの約4倍の高濃度懸濁液とすることもでき、酸素溶解度も高いし、懸濁液は4年以上安定とされている。perfluorocarbonの代謝はおもに呼気として排出され、貪食細胞や細網内皮系によって捕捉されるが、分解はされない。現在、第二世代のperfluorocarbon

の臨床試験を実施しているのはAlliance社とHemaGen/PFC社の2社である。第一世代のPerftoran™はロシアで認可されている。

① Oxygent……アメリカAlliance Pharm.社はperfluorooctyl bromide (Perflubron)を3つの医療材料(Imaging剤、酸素運搬体、液体換気)に応用している。卵黄レシチンを使ってperflubronを懸濁させたOxygent™(酸素運搬体)は安価で、血中滞留時間も長く、また原料に制限がない利点がある³²⁾。腫瘍酸素化にも優れているが、術前貯血のための補助剤(acute normovolemic hemodilution)としての利用を主眼としている。安全性試験(臨床第I,II相試験, n; 340)ではFluosolや脂肪乳剤のIntralipidにみられるような血小板活性化はなく、サイトカイン放出による風邪様の症状が副作用として報告されている以外に問題はない。欧米では合計246名の患者に対し術前血液希釈の試験が行われ、とくに副作用なく、輸血の必要性が低下したとしている。現在第III相試験実施の準備を進めている。Perflubronは液体換気液(LiquiVent™)³³⁾としても利用され、成人呼吸窮迫症候群や新生児肺胞硝子膜症、溺水時あるいは煙を吸引したさいの呼吸困難からの回復に優れた効果を発揮する。これは肺胞内面全体にLiquiVentが広がり気体交換を促すとともに、肺胞が開いた状態を保たせるため、使用後の除去も容易にできる。臨床試験は、第II相を完了し、FDAも支援している。1996年の段階で700人以上の人がLiquiVentを使った治療を受け、有効性が十分に示されている。

② Oxyfluor……アメリカHemaGen/PFC社はperfluorodichlorooctane (PFDCO)を卵黄レシチンとサフラワー油で安定化した40%エマルジョン(Oxyfluor™)を開発した³⁴⁾。室温で1年以上安定で、大気下17.2%の酸素を溶解できる。出血ショック蘇生など、前臨床試験では酸素運搬体としての機能が証明されたが、臨床第I相試験では副作用として微熱と風邪様の症状、投与4日後に血小板減少などが認められた。投与量をあまり必要としない外科患者を対象とした臨床試験(1995年から)が開始されている。また、通常体外循環の後には微小栓塞が形成されやすいが、Oxyfluorは栓塞形成を予防する効果があるとされている。

③ Perftoran……perfluorodecalin と perfluoro-methylcyclohexylpiperidine を水溶性高分子 proxanol (polyoxyethylene と polyoxypropylene の共重合体) で懸濁させた溶液をロシア Perftoran 社が展開している³⁵⁾。PFC 濃度が10%、粒子径が30 nm と小さい。粒子は室温で不安定なので、冷蔵保存が前提となる。すでに臨床試験も終了しており、最近では日本への売込みが行われている。

2. リピドポルフィリンを用いる酸素輸液

Burk らは1946年にCo-histidine 錯体が酸素を可逆的に吸脱着すると報告した。翌年葛島らはこれを酸素輸液へ応用することを試みたが、成功しなかった。Hbの活性部位であるプロトポルフィリンIXはグロビンから脱離すると同時に酸素結合能を失うことはよく知られており、高分子鎖の構築する立体枠組みの役割の重要性はよく認識されていた。その後、グロビンの機能代替ができる系の展開に注力されるようになり、各種ポルフィリン誘導体を検討し、水相系で可逆的に酸素を結合する能力のあるリピドポルフィリン:5, 10, 15, 20-tetrakis[$\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -o-[2', 2'-dimethyl-20' (2"-trimethylammonioethyl)phosphonatoxyeicosanamido]phenyl] porphyratoiron (II) の合成に土田らが成功している³⁶⁾。

この、リピドポルフィリンをリン脂質と混合して水相に分散して構成される粒径の揃った二分子膜小胞体は、生理条件下において赤血球内Hbと同様に可逆的な酸素配位が可能となる。血液と同じヘム濃度の赤い色をしたこの水相系は全合成系酸素輸液としての役割を果たすことができ、小林らによる動物投与試験は詳細な結果を得ている。出血ショックモデル犬の蘇生試験では、ヘム濃度に応じた酸素運搬力が確認³⁷⁾され、今日合成ポルフィリンの種類も増え、栄養輸液の成分:トリグリセリドの表面をリピドポルフィリンで被覆した系³⁸⁾、heme誘導物質が単独で形成する小胞体、さらにまたこれが集合して線維を形成、これらはいずれも可逆的な酸素結合が可能系である³⁹⁾。また興味ある事実として、ヒト血清アルブミンが小型リピドヘム8個を安定に包接でき、これがきわめて有効な酸素輸液として作動すること⁴⁰⁾などが明らかにされており、引き続き投与実験が進行中

である。

■おわりに

動く臓器とも称される血液は実に多彩な機能を発揮しているが、その成分として最大量である蛋白質のHbは、詳しく結晶解析された最初の蛋白質である。また、アロステリック効果が分子機能にほかならないことも早くから明らかにされたように、Hbは現在もっとも詳細に検討された蛋白質であるといつてよい。Hbの生理作用もきわめて明瞭になっているが、酸素輸液としてHbを利用する考えが出発した当時(1960年代)には、この種の輸液の投与に基づく生理作用の多くは、まだ明確になっていなかった。赤血球の酸素輸送機能を代替できる系を誕生させるには、実に多くの基礎知見を踏まえた展開と新技術の確立のための時間が必要である。赤血球機能と構造の相関とそれによる生体全機能を十分理解することは重要であり、小胞粒子の分散系がレオロジー条件を満足させるための必須条件であることも容易に理解できる。したがって、代謝過程の詳細はさらに検討を重ねる必要があるものの、ヘモグロビン小胞体やリピッドヘム小胞体などを用い、ほぼ完全な形で血液に代わって酸素供給を支障なく遂行できる点も確認されるに至り、人工血液は具体化に向けて数歩前進した。

現在開発中の人工血液(酸素輸液)は、あくまでも短期間の体組織呼吸のための投与に限られた用途を確立したものであるが、赤血球よりも小粒径である利点を生かしたさまざまな用途が現在試されている。欧米と日本に限られていた人工血液の研究は現在では、輸血体制が十分でない中南米やアジア諸国(ブラジル、メキシコ、中国、台湾、韓国など)でも研究が始まっている。まさに世界規模の関心に拡大されてきている現状にある。

謝辞:厚生科研費(高度先端医療研究事業:人工血液)による調査推進内容から、本稿はまとめられたことを付記し、謝意を表する次第である。

本稿校正中に関口定美博士(北海道赤十字血液センター所長)の訃報が届いた。現在の輸血システムの確立と定着に渾身の御努力をされただけでなく、医科学

者の良心から将来を見越した人工血液の実現に向け精魂を傾けられ、日本血液代替物学会の設立（1991年）以来、足かけ9年間に亘り副会長として貢献された。先生の人類愛に満ちた血液事業に対する献身は、日常の御仕事に加え、車椅子に拠って厚生省や日本赤十字社の血液関連の委員会に参加され、将来指針の御審議や、新分野開拓に情熱を注いだ研究活動に、終生変わることなく尽力された。この領域の先駆者として足跡を残された関口定美先生が、尊い命を賭けて頂いた先生ご自身の人生に対し、心からの尊敬、それに限りない謝意と哀悼をここに記し、ご冥福を祈りたい。

文献

- 1) Lenny, L. L. et al. : *Transfusion*, **35** : 899-902, 1995.
- 2) Tsuchida, E. (ed.) : *Blood Substitutes : Present and Future Perspectives*. Elsevier Science, Amsterdam, 1998.
- 3) Winslow, R. M. : *Nature Med.*, **1** : 1212-1215, 1995.
- 4) Yabuki, A. et al. : *Transfusion*, **30** : 516-520, 1990.
- 5) Bone, H. G. et al. : *Crit. Care Med.*, **25** : 1010-1018, 1997.
- 6) Rhea, G. et al. : *Crit. Care Med.*, **24** : A39, 1996.
- 7) Patel, M. J. et al. : *Blood*, **91** : 710-716, 1998.
- 8) Gonzalez, P. et al. : *J. Invest. Med.*, **45** : 258-264, 1997.
- 9) Kasper, S. M. et al. : *Anesth. Analg.*, **87** : 284-291, 1998.
- 10) Vandegriff, K. D. et al. : *Biophys. Chem.*, **69** : 23-30, 1997.
- 11) Nozue, M. et al. : *J. Surg. Oncol.*, **62** : 109-114, 1996.
- 12) Looker, D. et al. : *Nature*, **356** : 258-260, 1992.
- 13) Murray, J. A. et al. : *Gastroenterology*, **109** : 1241-1248, 1995.
- 14) Doherty, D. H. et al. : *Nature Biotechnol.*, **16** : 672-676, 1998.
- 15) Baines, A. D. et al. : *Am. J. Physiol.*, **269** (*Ren. Fluid. Electrolyte Physiol.*, **38**) : F628-F636, 1995.
- 16) Whitley, D. et al. : *J. Surg. Res.*, **77** : 187-191, 1998.
- 17) Gould, S. A. et al. : *Ann. Surg.*, **211** : 394-398, 1990.
- 18) Gould, S. A. et al. : *J. Am. Coll. Surg.*, **187** : 113-122, 1998.
- 19) Djordjevich, L. and Miller, I. F. : *Fed. Proc.*, **36** : 567, 1977.
- 20) Hosoi, F. et al. : *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B.*, **131** : 329-334, 1997.
- 21) Rabinovici, R. et al. : *Red Blood Cell Substitutes* (ed. by Rudolph, A. S. et al.). Chapter 12, Marcel Dekker, Yew York, 1997, pp. 263-286.
- 22) Sakai, H. et al. : *Bioconjugate Chem.*, **8** : 23-30, 1997.
- 23) Sakai, H. et al. : *J. Biomed. Mater. Res.*, **40** : 66-78, 1998.
- 24) Rudolph, A. S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88** : 10976-10980, 1991.
- 25) Whiteford, M. et al. : *Shock*, **9** : 428-433, 1998.
- 26) Sakaguchi, K. et al. : *Jpn. J. Artif. Organs.*, **22** : 560-565, 1993.
- 27) Olsen, S. B. et al. : *Circulation*, **93** : 327-332, 1996.
- 28) Nakai, K. et al. : *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28** : 115-123, 1996.
- 29) Goda, N. et al. : *J. Clin. Invest.*, **101** : 604-612, 1998.
- 30) Spence, R. K. et al. : *Crit. Care Med.*, **18** : 1227-1230, 1990.
- 31) Tremper, K. K. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **307** : 277-283, 1982.
- 32) Hogan, M. C. et al. : *J. Appl. Physiol.*, **73** : 2470-2475, 1992.
- 33) Leach, C. L. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **335** : 761-767, 1996.
- 34) Goodin, T. H. et al. : *Crit. Care Med.*, **22** : 680-689, 1994.
- 35) Khrupkin, V. I. et al. : *Vestn. Khir.*, **156** : 53-55, 1997.
- 36) Hasegawa, E. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105** : 1416-1419, 1982.
- 37) Kobayashi, K. et al. : *Artificial Red Cells* (ed. by Tsuchida, E.). Wiley, New York., 1995, pp. 93-116.
- 38) Komatsu, T. et al. : *Jpn. J. Artif. Organs.*, **22** : 550-553, 1993.
- 39) Tsuchida, E. et al. : *Langmuir*, **11** : 1877-1884, 1995.
- 40) Komatsu, T. et al. : *Blood Substitutes, Present and Future Perspectives* (ed. by Tsuchida, E.). Elsevier Science, Amsterdam, 1998, pp. 315-326.

* * *

人工酸素運搬体

—その臨床応用を目指して—

Clinical Application of Artificial Oxygen Carrying Substances

小林 紘一* 田島 敦史*

Key words
人工酸素運搬体, 出血性ショック, 腫瘍感受性, 液体換気

はじめに

感染のおそれのない、血液型を考慮せずに使用でき保存も簡単な人工酸素運搬体が開発されれば人類にとって有用である。現在臨床応用を目指して開発中のものには本号の武岡、薄場論文に述べられているようにパーフルオロカーボン、ヒトやウシなど生体由来のヘモグロビンを利用したもの、完全合成系のもの、アルブミンの立体構造の中にヘムを誘導したものなどがある。

人工酸素運搬体の臨床応用には出血性ショック、臓器保存の灌流液や体外循環の補填液、腫瘍組織を酸素可しておいて放射線などに対する治療効果を高めるなどの他にパーフルオロカーボンは一酸化炭素中毒の治療やX線非透過性なので造影剤として使用される可能性もある。

本稿では人工酸素運搬体の使用法のいくつかを紹介する。

1. 急性出血やショックに対する静脈内投与

人工酸素運搬体の利用法として最も期待されているのは急性の大量出血に対する静脈内投与であり将来的には救急車や救急外来に常備されるようになり、また災害や事故などによる大勢の被害者がでた時にも対処できるようになるであろう。

人工酸素運搬体のうち、Baxter Healthcare社製のヘモグロビンの分子内に架橋を置いた disaspirin cross linked hemoglobin (DCLHB) HemeAssist™ は粒子が小さいため血管内皮に近接することができ血管内皮よりの血管拡張作用を持つ nitric oxide

(NO) を吸着し血圧を上昇させることが知られている。この性質を利用しNOの産生が高まっている septic shock に対しこのDCLHBを投与しnorepinephrineの使用量を減じることができたという報告がある(図1)¹⁾。

2. 液体換気

肺胞を液体で満たしてこの液体を出し入れしてガス交換を行う方法を液体換気 (liquid ventilation) という²⁾。用いられる液体の条件は酸素や二酸化炭酸ガスの溶解度が高いことであり、パーフルオロカーボンのうち構造式にBrを含む米国のAlliance社製のPerflubron (商品名LiquiVent), C₈F₁₇Brが臨床応用されている。液体換気の方法には二種類あり、一つは気道全てを液体で満たす完全液体換気 (total liquid ventilation, TLV) と、機能的残気量 (残気量と一回換気量を合わせた肺気量) のレベルで肺を換気する部分液体換気 (partial liquid ventilation, PLV) がある。TLVは二酸化炭酸ガスの排出が悪く、換気のための特殊な装置が必要となり、現在のところはPLVが一般的である。

Greenspanらの用いた新生児に対するPLVのシステムを図2に示す³⁾。

図3はLeachらによる10例の新生児呼吸窮迫症候群 (Infantile Respiratory Distress Syndrome) に対するLiqui Ventを用いたPLVの治療データで動脈血酸素分圧 (PaO₂) は上昇し、吸入気酸素分画 (FiO₂) を下げることができ、二酸化炭酸ガス分圧 (PaCO₂) は低下し、dynamic complianceも改善している⁴⁾。

田島らは実験的に生理食塩水で肺胞を洗浄し肺表面活性物質を除去して作成した肺障害に対しヒ

*Koichi Kobayashi, Atsushi Tajima: 慶應義塾大学医学部外科 Department of Surgery, School of Medicine, Keio University

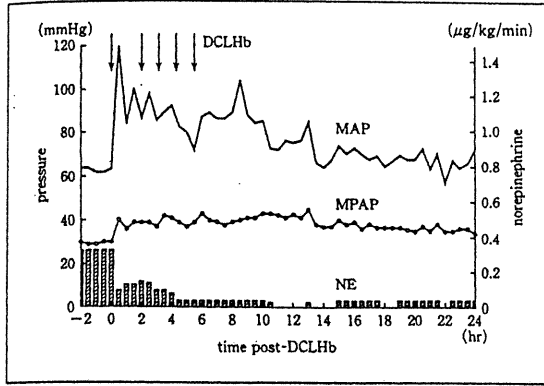


図1 敗血症患者におけるDCLHBの効果
5回にわたって500mlのDCLHBを投与することにより、ノルエピネフリンの使用量を減少させることができた。
MAP：mean arterial pressure
MPAP：mean pulmonary arterial pressure
NE：norepinephrine

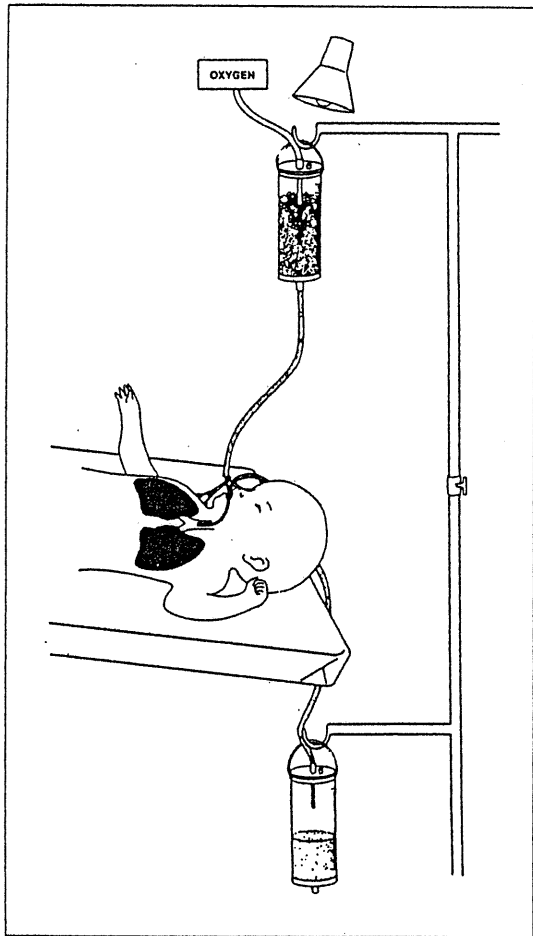


図2 PLVのシステム

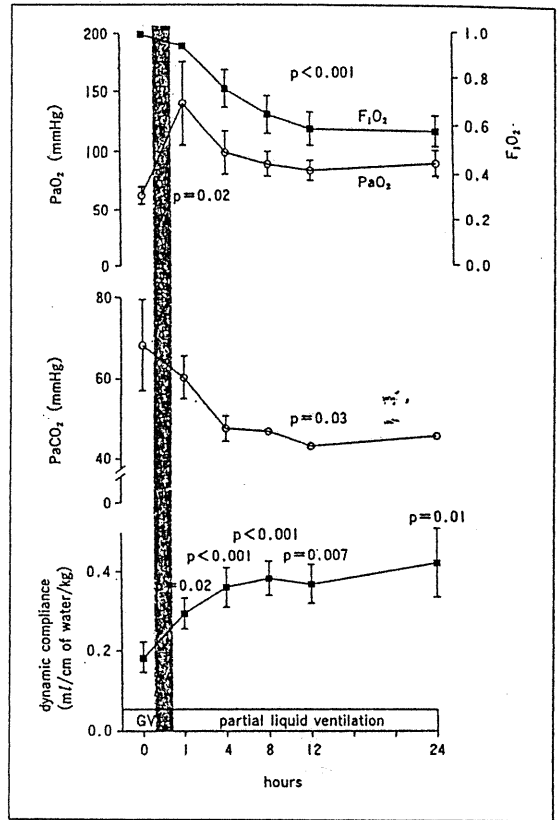


図3 LiquiVent Study Groupによる未熟児重症RDS 10例に対するPLVの効果
(文献4：Leach CL et alより引用)

ト由来のヘモグロビンをリポソーム内に包み込んだリポソーム包埋ヘモグロビン (liposome-encapsulate-hemoglobin, LEH) を用いてPLVを行う群、生理食塩水でPLVを行う群および機械呼吸のみを継続する群 (CWV) の三群に分けて治療を行ったところLEH群のPaO₂が一番高く維持できLEHをPLVに使用できる可能性を示唆している (図4)。

重傷呼吸不全には血液ガスの異常とともに血行動態的には肺動脈圧の上昇をとまうことが多く、それらに対してPLVとともにnitric oxideを吸入させたり⁵⁾、prostaglandinE₁ (PEG₁) を投与することに治療効果を上げようとする試みもなされている (図5)⁶⁾。

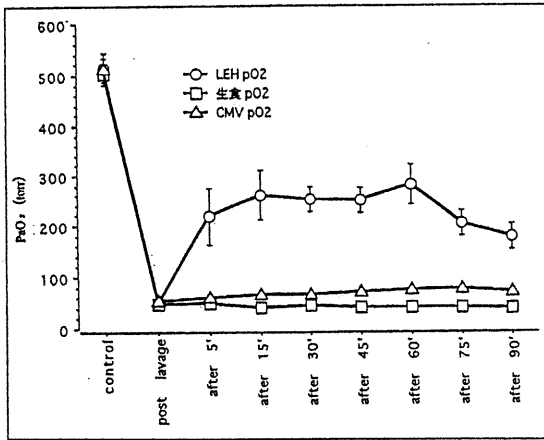


図4 PaO₂の変化

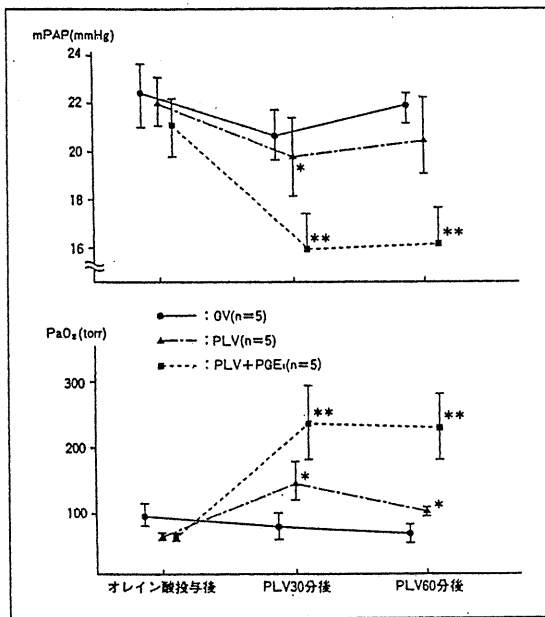


図5 ウサギに対しオレイン酸肺水腫を作成し、PLV、PLV+PGE₁の効果を検討したもの(各群n=5、文献6より引用)
肺動脈圧はPGE₁ (0.1 μg/kg/min) を経気道的に投与することで有意に低下し、PaO₂も有意に上昇する。各群n=5、GV:ガス換気群、*:p<0.05、** : p<0.01 (オレイン酸投与後との比較)

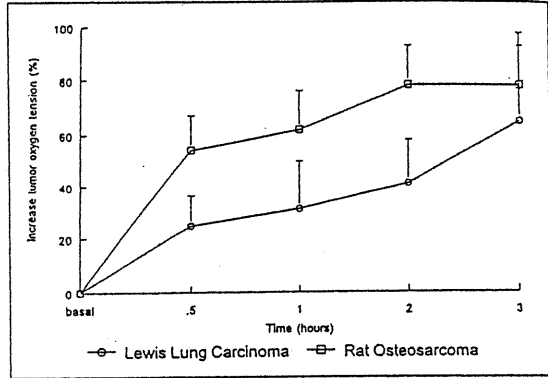


図6 腫瘍表面の酸素分圧に与えるPEG-hemoglobinの効

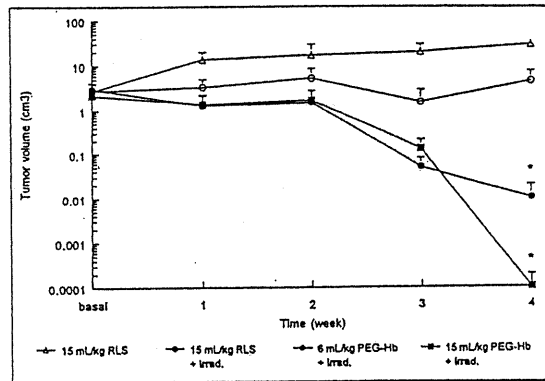


図7 PEG-hemoglobinの放射線照射の腫瘍容量に与える影響
RLS: 乳酸リンゲル液 irradi: 放射線照射

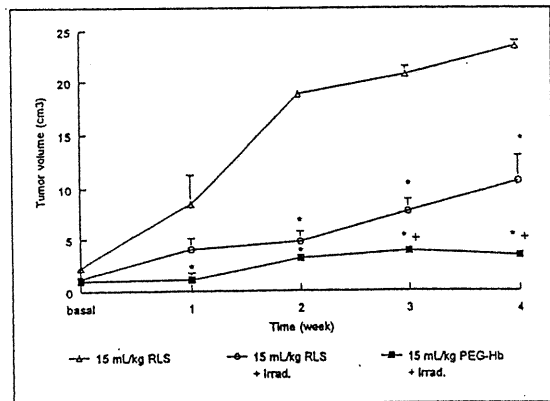


図8 乳酸リンゲル液のみ、乳酸リンゲル液+放射線、PEG-hemoglobin+放射線の腫瘍容量に与える影響

3. 酸素運搬体を投与することにより腫瘍の抗癌剤や放射線に対する感受性を高める試み

人口の高齢化により癌の罹患率も高くなることが予想される。

一般に腫瘍内の酸素分圧は低く、これが抗癌剤や放射線療法に対し抵抗を示す一因となっている。静脈内に人工酸素運搬体を投与し、腫瘍組織内の酸素分圧を高め治療効果を上げようとする試みがなされている^{7, 8, 9)}。

図6はウシのヘモグロビンの表面にポリエチレングリコールを重合させ高分子化し血中滞留時間を長くし、また血管収縮作用も低くした polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin (PEG-hemoglobin) を担癌動物に静脈内投与すると腫瘍表面の酸素分圧が上昇する(図6)⁷⁾。図7は乳酸リンゲル液およびPEG-hemoglobinを投与し、放射線治療による腫瘍容量の変化を見たものであるがPEG-hemoglobinを投与し腫瘍内の酸素分圧を上昇させておいた方が腫瘍容量の増加を抑えることができ、その程度はPEG-hemoglobinの投与量に依存している⁷⁾。図8はヌードマウスに移植した前立腺癌の腫瘍容量の経時変化を治療手段毎に見たものであるがPEG-hemoglobinと放射線療法を同時に行った群の成績がPEG-hemoglobinの対照として乳酸リンゲル液を投与した群よりも良好で腫瘍の酸素加は腫瘍の放射線治療による効果を高めていることが分かる⁷⁾。

おわりに

生命の維持にとって重要な酸素を赤血球に代わって行いうる人工酸素運搬体にはいろいろな臨床応用が考えられる。安全で効用の高い人工酸素運搬体の開発が待たれる。

文 献

- 1) Rash G, Bodenham AR, Mallik A *et al.* Initial evaluation of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHB™) as a vasopressor in critically ill patients. *Crit Care Med* 25 1480-1488, 1997.
- 2) 浜口正道, 岡元和元. Liquid ventilation. *集中治療* 10 : e36-e40, 1998.
- 3) Greenspan JS, Wolfson MR, Rubenstein D *et al.* Liquid ventilation of human pretermneonates. *J Pediatr.* 117 : 106-111, 1991.
- 4) Leach CI, Greenspan JS, Rubenstein D *et al.* : Partial liquid ventilation in premature infants with severe respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 355 : 761-767, 1996.
- 5) Houmes RJM, Hartog A, Verbrugge SJM *et al.* Combining Partial liquid ventilation with nitric oxide improve gas exchange in acute lung injury. *Intensive Care Med* 23 : 163-169, 1997.
- 6) 中沢弘一: 特集ARDSに対する最新の治療法—その効果と限界— *Liquid ventilation 集中治療* 9 : 1005-1012, 1997
- 7) Linberg R, Conner CD, Shum KL, *et al.* : Increased Tissue Oxygenation and Enhanced Radiation Sensitivity of Solid Tumors in Rodents Following Polyethylene Glycol Conjugated Bovine Hemoglobin Administration *in vivo* / 2 167-174, 1995.
- 8) Berberly A, Teicher, Gulshan Ara, Ying-nan Chen *et al.* PEG-hemoglobin : Effects on Tumor Oxygenation and Radiosensitization. 4 : 200-210, 1996.
- 9) Nozue M, Lee I, Manning, JM. *et al.* : Oxygenation in Tumors by Modified Hemoglobins. *J. Surg Oncology* 62 : 109-114, 1996

<培養工学ニュース>

日本環境変異原学会第27回日本環境変異原学会大会

会期：1998年11月24日(火)～1998年11月26日(木)

会長：菊池 康基(株)ラビトン研究所大阪医薬品臨床開発研究所センター長)

主会場：メルパルク大阪

今期大会事務局：〒565-0082 豊中市新千里東町1-4-2 (株)ラビトン研究所

電話：06-873-2221 FAX：06-873-2225

主なプログラム：特別講演 生殖生物学について

モーニングレクチャー テロメア, テロメララーゼについて/アポトーシス修復/ヒト代謝系について/リスクアセスメント

シンポジウム：ダイオキシンの生体影響/環境汚染変異原

パネルディスカッション：ガイドラインと基礎研究の接点

ミニシンポジウム：コメント法

総説 1

ヘムオキシゲナーゼ／一酸化炭素系による 臓器機能制御機構

末松 誠, 若林 良之, 牧野 信也, 高宮 里奈, 合田 亘人, 石村 巽
慶應義塾大学医学部医化学

はじめに

著者らは生体内で生成されるガス状物質のひとつである一酸化炭素(CO)が正常の肝臓で血管拡張物質として作用することを見出した^{1,2)}。肝臓の毛細血管に相当する類洞はわずか数cm H₂Oの圧格差で血流が維持されており、その血管抵抗は未知のメカニズムで恒常的に低く保たれていると考えられてきたが、内因性に生成されたCOがそのメカニズムを担っていると思われる。またCOは肝実質細胞の重要な機能の一つである胆汁分泌の調節にも関与することが示唆された³⁾。これらの所見は生体内での主要なCO生成系であるheme oxygenaseの阻害物質であるzinc protoporphyrin IXの投与による血管抵抗や胆汁流量の変動から得られた知見から得られたが、肝臓を含め臓器内の酵素分布、個々の細胞のCO生成能、さらにレセプターとなる標的分子と考えられている可溶性guanylate cyclaseの活性化能のNOとの隔たりなど未解決な問題が山積していた。著者らはこれらの問題を解決するため、heme oxygenase isozymeの単クローン抗体を作成し組織内の分布を詳細に検討すると同時に、近年血管抵抗の調節以外にもCOが種々の細胞機能を調節する内因性メディエーターであることを明らかにしつつある。本論文では最近の遺伝子改変動物での知見も踏まえheme oxygenase-CO系の生理学的意義を概説する。

1. 内因性COの生成系：heme oxygenase

生体内ではCOはそのほとんどがヘム分解の律速酵素であるheme oxygenaseにより生成されるが酵素の体内分布、COのレセプターについてはまだ十分な知見が得られていないのが現状である。本酵素はヘムのボル

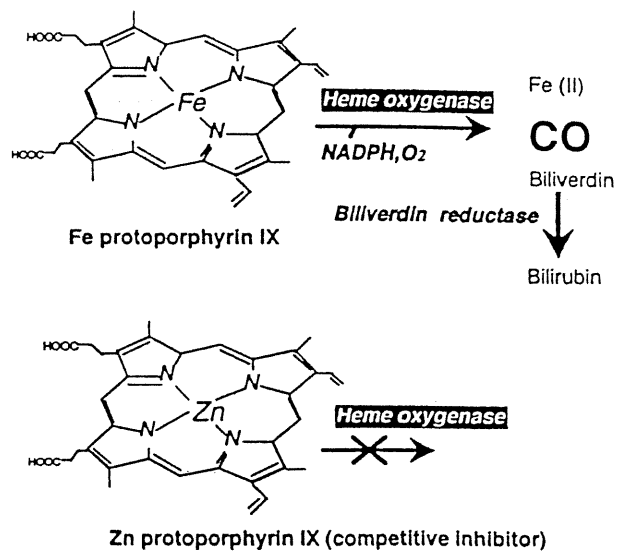


図1 heme oxygenaseによるヘムの酸化的分解とCOの生成。

zinc protoporphyrin IX (ZnPP) はheme oxygenaseの拮抗阻害剤であるがguanylate cyclaseやNO synthaseなど種々のヘム酵素に対する直接の阻害効果も知られている。

フィリン環への酸素添加反応により、 α -メテン炭素での開裂が起こり、同モルの一酸化炭素と鉄-ビリベルジン錯体が生成され、これがNADPHチトクロームP-450リグクターゼにより還元され、鉄とビリベルジンが生成する(図1)⁴⁾。ビリベルジンはビリベルジンリグクターゼによりビリルビンとなり、抱合されて胆汁中に排泄される。HOにはストレス応答で誘導されるHO-1⁵⁾と、構成型のHO-2⁶⁾が知られている。HO-1の遺伝子発現調節領域にはHRE(hypoxia responsible element), AP-1, NF- κ Bなどのドメインがあり種々の生体侵襲に反応して蛋白の発現が起こる。これに対してHO-2は発現誘導因子の報告がなく構成型として存在する(図2)。

*慶應義塾大学医学部 医化学 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町35)
Department of Biochemistry School of Medicine, Keio University,
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku Tokyo 160-8582, JAPAN

HEME OXYGENASE ISOZYMES

PROPERTIES	Heme oxygenase-1	Heme oxygenase-2
Molecular weight	32 KDa	36KDa
Km for protoheme IX	0.24 μ M	0.40 μ M
Inducers	Heme, endotoxin, oxidants, (heat shock)	not known

図2 heme oxygenase isozymes (HO-1 HO-2) の比較 (文献6より引用)

HO 活性の高い臓器としては脳, 脾, 肝があげられ, 脳や肝では HO-2 活性が優位であるのに対し, 赤血球破壊の場である脾では HO-1 が優位である⁶⁾. HO-1, -2 の反応は拮抗阻害剤である zinc protoporphyrin IX (ZnPP) で抑制されることが知られている. しかしながらこの薬剤は高濃度ではヘム酵素である可溶性 guanylate cyclase の抑制作用⁷⁾, iNOS や nNOS の抑制作用⁸⁾, さらに voltage-dependent Ca channel の活性化⁹⁾などの作用も知られている. したがって局所において CO がメディエーターとして作用を發揮していることを検証するためには CO の存在証明と, ZnPP 投与による機能変化がどの程度外因性に投与した CO で回復できるかを検証する必要がある.

2. CO, NO のヘム蛋白との相互反応の違い／

ヘモグロビンと guanylate cyclase を例として

CO と NO は同じガス状物質でありながらヘム蛋白にある補欠分子である protoheme IX と反応した結果生じる蛋白分子の構造変化や自身の代謝様式には決定的な違いがある. CO は同じ低分子モノオキシドである NO 同様可溶性 guanylate cyclase を活性化することが種々の細胞で示されてきた^{2,10,11)}. しかしながら, 精製酵素標品を用いた検討では本酵素の感受性には大きな差があり, CO による in vitro で精製された guanylate cyclase の活性化は NO の約1/50-1/100程度と報告された¹²⁾. これは NO がヘムに結合し遠位のヒスチジンの配位が切れて酵素分子の構造変化が起こるのに対し, CO では結合が弱く, 配位が切れずに構造変化が起こりにくいことと推測されている. したがって, 生体局所で CO が NO に代わって本酵素を活性化するには50-100倍以上の濃度が必要と考えられる.

一方 NO はラジカル分子のため, ヘモグロビンによる除去も CO に比べすみやかであり, CO のヘモグロビンへの結合力は NO の約 1/3000 とされている. しかしな

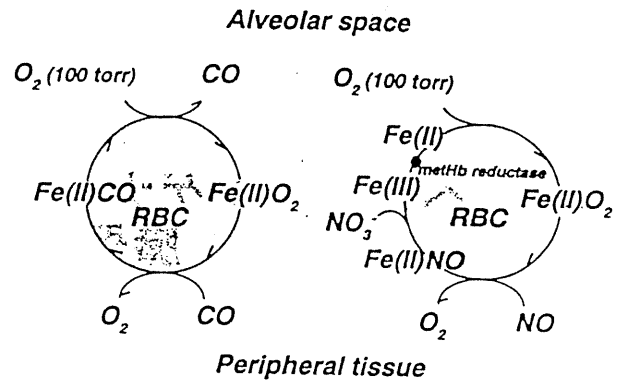


図3 体内における赤血球によるCOとNOの排泄と分解.

CO は還元型ヘモグロビンと結合し肺からガスとして排泄され, NOはNO₃⁻として尿中に排泄される. COは還元鉄を持つヘモグロビンに結合するが酸化ヘム鉄には結合しない. NOは双方と反応する.

がら生体内での消去系となる赤血球のヘモグロビンとの相互反応は大きく異なっている. すなわち NO と結合した赤血球内の2価鉄のヘモグロビンは分解して硝酸イオンとメトヘモグロビンに変換し, メトヘモグロビンは還元されて元の2価鉄のヘモグロビンにリサイクルされるのに対し, CO は一度, 2価鉄のヘモグロビンに結合すると安定な複合体 (ferrous-CO complex) を作り, 肺のガス交換に際して酸素と可逆的に置き換わり, 呼気中にそのままの形で排泄される点の特徴である (図3). したがって, 健康人の血中には通常1-2%程度のヘモグロビン-CO 複合体が検出できる. 一方, NO は非ヘム鉄やSH基との反応性も高いことが知られており, 分子状酸素による消去が起こるのに対し, COにはこれらの属性は見られない. さらに水溶液中での半減期が桁はずれにCOの方が長いことを考えあわせると, 肝, 脾, のようなCO生成能が高いと思われる臓器でのcGMPを介した情報伝達をどちらのメディエーターが司るかを量論的に議論する必要性が現われた.

一方, NO と CO の guanylate cyclase 活性化能の違いは in vitro における酵素の精製標品による検討であるが故に生じたものである可能性も最近示唆されている. Koesling らのグループはウシ肺から精製した酵素標品を用い, YC-1 とよばれる抗血小板薬が酵素の CO による cyclic GMP 生成能を100倍程度活性化することを報告した¹³⁾. YC-1 は生体内物質ではないが, もし細胞内に YC-1-like cofactor が存在すると仮定すると, 細胞に添加した CO が cGMP を上昇させ, cofactor がはずれた精製酵素が CO に対して感受性が低い理由が説明できる. このような事例は guanylate cyclase の例を見る

までもなく、過去に精製ヘモグロビンの酸素親和性と赤血球内のヘモグロビン酸素親和性との discrepancy から、蛋白の精製過程で失われた赤血球内の2,3-bisphosphoglyceric acid (2,3-BPG) がヘモグロビンのアロステリックエフェクターとして見いだされたのはその典型である。いずれにしてもCOの血管作動性は微小環境、とくに生成部位周辺でのNO生成量とヘモグロビン濃度により大きく影響を受けると考えられる。

3. 肝におけるCOおよびNOの生成量

ラットの分離灌流肝を用いたわれわれの検討では、正常灌流肝では肝静脈からのサンプル中約200~300nm程度のCOが遊離してくることが、ミオグロビンを用いた分光分析で明らかとなった^{2,3)}。これは流量にして約0.7 nmol/min/g liverに相当する。分離灌流肝ではヘモグロビンのような酸素運搬体なしで肝臓のviabilityを維持するため流量が正常の門脈血流の4倍程度あるため上記の約4倍程度の濃度(1 μM内外)のCOが類洞周辺の恒常的に維持されていると考えられる。肝におけるCO生成系は全体の約2/3が肝実質細胞に局在するといわれている。著者らは半透膜で仕切られた二層式のバイオリアクターを用い、その一方に肝細胞を高密度培養し、他方から培養液をサンプリングすることにより、分離細胞のCO生成能を検討している¹⁴⁾。初代培養分離肝細胞を用いた検討では、分離直後の肝細胞で約30nmol/hour/10⁸cells程度のCO生成が検出でき、時間依存性に生成量は低下した。これは湿重量1gに約10⁸個の肝細胞が存在すると仮定するとほぼ0.5nmol/min/g liverに相当することから、正常肝では肝細胞からのCOの生成が大部分を占めることになる。またHOはヘムを分解し同モルのビリベルジンとCOを生成し、ビリベルジンは同モルのビリルビンに変換されるため、COとビリルビンの生成量の量的関係はほぼ一致する。肝微小循環系は、肝実質細胞から遊離されたCOに常に曝露されている状態と考えられる。もちろんこれらは分離灌流系を用いた測定に基づく概算であり、生体内では類洞血流から供給される遊離ヘムや老廃赤血球由来のヘモグロビンをKupffer cellが代謝する可能性も考慮すると、実際のCO生成量はさらに増加すると思われる。

COによるguanylate cyclaseの活性化が成立するためにはNOの濃度がCOに比してかなり低いことが要件となる。NOは最終代謝産物であるNO₂⁻、NO₃⁻をGreiss法によって測定したり、スピントラップ剤で捕捉してESRで検出可能である。正常肝灌流モデルではGreiss法での検出感度以上のNO_xは検出できないが、DeckerらのグループのESRによる計測によればスピ

ントラップ剤で直接捕捉できるNOの生成は30pmol/min/g liver程度であった¹⁵⁾。NOは酸素の存在下で速やかにNO₂に変換されるがMiskoらは肝灌流モデルでのsteady-stateのNO₂生成をdiaminonaphthaleneを用いた蛍光法¹⁶⁾により評価している。これによると肝静脈灌流液中のNO₂はたかだか0.1nmol/min/g liver程度である。したがって局所における遊離NOの実効濃度はさらに低く、COのそれと比べても著しく低いと思われる。また、生成したNOは肝臓においておそらくKupffer cellなどで生成されるO₂によって消去されることがSpitzerらのグループによって明らかにされた¹⁷⁾。したがって、類洞周辺においてcGMPの上昇に関与するNOの濃度は予想以上に低い可能性がある。このように試験管内ではNOはCOに比べ、guanylate cyclaseの活性化能が高いが、生体内の肝微小環境においてはCO濃度がNO濃度より極めて高いと考えられるために、COが循環制御調節因子としてより重要である可能性が示唆された。

4. 肝臓でのCO生成部位と肝類洞収縮反応の調節メカニズム

肝臓で定常状態で生成されているCOは、heme oxygenaseの拮抗阻害剤であるZnPP(図4)を投与すると検出できなくなる。この状態での灌流肝は約30%の血管抵抗の増加を示すようになる。ここに1 μM程度のCOあるいは膜透過性のcGMPアナログである8-Br-cGMPを投与すると灌流圧の上昇は抑制されたことから、内因性に生成されるCOが、steady stateにおける肝血管抵抗の調節因子であることが示された^{2,3)}。この抵抗要素は門脈血管でなく類洞血管であることを、生体顕微鏡下の肝微小循環観察法で調べることができる²⁾。この際、類洞は不連続性の収縮を示すが、収縮部位が血管周皮細胞である伊東細胞に一致した。類洞には平滑筋細胞が存在せず、周皮細胞が収縮要素として作用するわけだが、同条件下ではL-NAMEやaminoguanidineのようなNO synthase阻害剤を1 mM投与しても昇圧反応が起らない。以上のことから、NOはsteady-stateでの肝血管抵抗の調節因子とは考えにくいと思われた(図4)。またこの類洞収縮反応はα1 agonistであるphenylephrine 500nMでは起らない。このとき血管抵抗は30%程度上昇するため、おもな収縮部位は門脈のレベルに起こると考えられる²⁾。

前述のようにZnPPはheme oxygenaseの阻害以外の薬理活性が知られているため、著者らはheme oxygenaseを抑制せずに、肝臓内局所のCOをトラップするものがZnPPで見られたような血管収縮作用を発

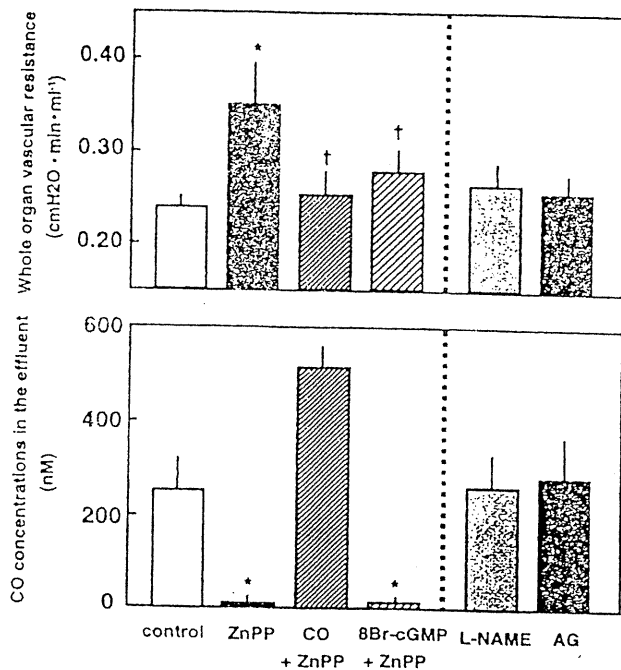


図4 ラット分離灌流肝におけるCOの生成と血管抵抗に対する各種薬剤の効果

(文献²⁾より許可を得て引用)。

ZnPP: zinc protoporphyrin IX heme oxygenase 阻害剤。L-NAME, AG (aminoguanidine) はNO synthaseの阻害剤。

揮するであろうと考え、NO、COをとともに捕捉する oxyhemoglobin と、NOは捕捉できるがCOとの結合が起こらない methemoglobin 投与による血管反応の変化を検討した¹⁹⁾。正常の灌流肝ではNOやCOの捕捉剤である oxyhemoglobin を投与すると、血管抵抗の上昇に伴い ZnPP で見られたような類洞の不連続性狭小化が起こる。しかしながらNOは捕捉するもののCOを捕捉できない methemoglobin ではこれらの変化は起こらなかった。興味深いことに oxyhemoglobin を類洞内皮細胞の fenestration を通過しない250nm 程度のリポソームに封入し投与すると、血管抵抗の増加が起こらなくなった。これらの所見から Disse 腔のような類洞外空間におけるCOが維持されることが肝類洞血管抵抗を低く保つために必要不可欠であることを示唆している。

5. 肝臓における heme oxygenase の分布と生理学的意義

肝臓は脳、精巣、脾臓とならび heme oxygenase の豊富な臓器のひとつである。しかしながら臓器のどの細胞に2つのHOアイソザイムが発現しているかに関する知見は乏しく、各臓器におけるCO生成系のコンパート

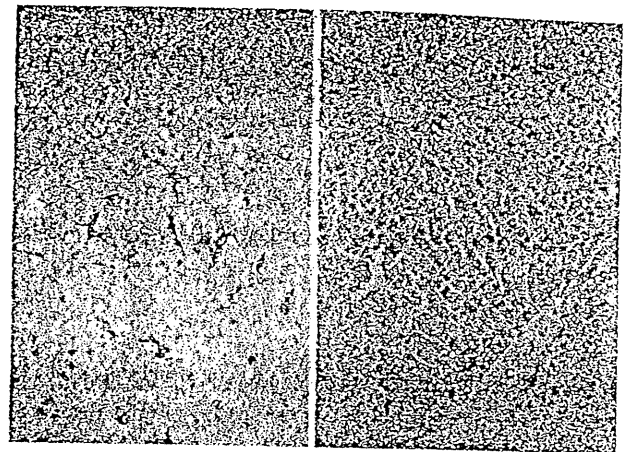


図5 新規抗ラットHO-1(左)、HO-2(右)単クローン抗体によるラット肝臓の単染色像。

P: Cはそれぞれ門脈終末枝、中心細静脈を示す。

(文献¹⁸⁾より許可を得て引用)

メントも十分には検討されていない。著者らは最近ラットのHO-1、HO-2の高発現細胞株を樹立し、これらの細胞のミクロソーム分画をマウスに免疫し交叉反応を示さない抗ラットHO-1、HO-2モノクローナル抗体(GTS-1、GTS-2)を作成した。これらの抗体を用いた免疫組織化学により、ラットの正常肝臓における検索を行った結果を図5に示す。左右はそれぞれはGTS-1、-2による単染色像であり、HO-1が類洞に面した不定形の細胞に発現しているのに対し、HO-2は肝小葉全体の肝実質細胞に発現しているのが判る。HO-1陽性細胞の同定をさらに詳細に免疫二重染色で検索したところHO-1陽性細胞は組織マクロファージを認識するKiM 2 R抗体で二重染色され、伊東細胞のマーカーである desmin の染色パターンと解離することから、HO-1はKupffer cellに発現していることが示された¹⁸⁾。また内毒素で刺激を受けた肝では、Kupffer cellのみならず肝実質細胞にも発現が増強することが示された¹⁸⁾。したがって灌流肝において類洞血管抵抗を低く保つことに寄与しているのは類洞血管外のCO生成系である肝実質細胞のHO-2であろうと著者らは考えている。

以上のような所見を背景に、著者らは分離培養した伊東細胞でも外因性に投与されたCOにより応分のcGMP生成の上昇がおこるはずであると考え、初代培養系におけるCOによるcGMP上昇の容量依存性を検討した。しかしながらin vitroの培養系では最低でも10 μ M程度のCOが有意なcGMPの上昇に必要であることが明らかになった²⁾。この濃度は先に示した、分離灌流肝の静脈灌流液中での濃度の約30倍(灌流量をin

vivoでの3倍と見積もっても10倍)の開きがある。主要なCO生成系である肝実質細胞と伊東細胞はともにヘモグロビンの存在しない類洞外空間に存在し互いに接しているため、このdiscrepancyは問題にならない可能性もあるが、COがguanylate cyclase以外の標的分子に作用して伊東細胞の弛緩反応に関与する可能性も否定できない。従来伊東細胞の膜電位の調節メカニズムについては電気生理学的解析が行われていなかったが、著者らはwhole cell patch clampによりこれを解析し、外向き、内向き整流性K⁺チャネルの存在と細胞間のgap junctional communicationの存在を証明した¹⁹⁾。これらのうち、外向きK⁺チャネルは他の細胞で膜上の未知のヘム蛋白と共役して酸素センシングを行う機構として注目されている。COによりこのチャネルの開口確率が上昇し、膜の過分極が起こって細胞の弛緩に関与するか否かを検討しようと試みたが、電流が血管平滑筋のそれに比べて極めて小さいため、現在まで確証を得ていない。伊東細胞の初代培養系は類洞のトーンの調節メカニズムを知る上で極めて有用である。この細胞は分離後数日は平滑筋細胞で収縮反応に重要な役割をはたすvoltage-dependent Ca²⁺ channelの発現は見られないが、platingによりphenotypeが日毎に変化し、培養4-6日以降、 α -smooth muscle actinの発現や、myofibroblastへの形質転換が起こり始める。このような形質転換はTGF- β などのサイトカインへの暴露でも起こることが知られており、肝硬変症における類洞血管抵抗の上昇、コラーゲン生成の上昇機序との関連が注目されている。

6. ヘムオキシゲナーゼノックアウトマウスの形質とCO

最近、ヘムオキシゲナーゼアイソザイムのノックアウトマウスがMITのTonegawaらのグループにより作成され、それぞれ異なった形質の発現が報告されている^{20,21)}。誘導型酵素であるHO-1ノックアウトマウスでは、コントロールの野性型と比較すると生存率が極端に悪くなっており、過齢とともに鉄欠乏性貧血が進行することから、HO-1が鉄の再利用に重要な役割をしていることが示唆されている²¹⁾。一方、HO-2のノックアウトマウスでは、発生は野性型と変化が認められず、組織化学的検討や血液の各種パラメーターに関しても異常は確認されなかったという。ところが、このマウスでは、アセチルコリン、コリン非依存性(NANC)腸管弛緩が抑制されることによる腸管内の食物の輸送遅延が生じていることが示された²²⁾。腸管弛緩は、外因性COを添加した際に濃度依存性に回復し、その反応は、可溶性グアニレートシクラーゼの阻害剤により完全に抑制されている。

HO-2は腸管においては神経細胞に部位特異的に発現が認められるが、HO-2のノックアウトマウスではCOの産生量が減少するために、可溶性グアニレートシクラーゼの活性化が减弱し、腸管弛緩反応が抑制されると考察している。事実、野性型と比較して、ノックアウトマウスではNANC腸管弛緩が誘導された際に生じるcGMP量の増加は減少しており、外因性にCOを1 mM加えることにより野性型と同程度まで回復している。これらの結果から、COが可溶性グアニレートシクラーゼの活性化を介して、神経伝達物質としての機能を持つと結論している。

COが、可溶性グアニレートシクラーゼを活性化させることは、培養細胞を用いた結果から紛れのない事実ではあるが、先に述べたように精製酵素標品を用いたin vitroでの検討では活性化能は極めて低い。またこれらのモデルでCOが神経伝達物質であると結論づけるにはいくつかの問題点が考えられる。著者らはHO活性が高いことが知られている肝臓(ラット)においてCO産生量をミオグロビンを用いた方法により計測を行っているが、灌流液中にはHO-1の誘導時でも高々数 μ M程度のCOしか検出されず、腸管局所におけるCO濃度がmMオーダーまで上昇するとは考えにくい。仮にNANC依存性腸管弛緩時にこのような高濃度のCOが生成されていれば等量のビリルビンが生成されているはずである。酵素発現のターゲティングによる実際のCOの生成量変化、HO-1誘導による代償機転が働く可能性など、COそのものの細胞機能調節作用が確立するためにはさらなる研究の進展が必要である。

7. COによるcGMP非依存性情報伝達機構の可能性

COには、可溶性guanylate cyclaseの活性化以外にも、いくつかの作用が報告されている。Farrugiaらは、空腸平滑筋細胞を用いた電気生理学的検討を行い、10 μ MのCOが外向きのK⁺チャネルの開口確立を上昇させ、膜の過分極を引き起こすことを報告している²³⁾。血管平滑筋のCOによる弛緩メカニズムは、従来NOと同様に細胞内のcGMP量を増加させることによるとされてきたが、これらの反応はcGMP非依存性の反応であり、COが細胞膜上の未知のヘム蛋白をレセプターとして細胞機能を調節している可能性が考えられている。実際に、COが膜の過分極を引き起こすことにより、平滑筋細胞の弛緩反応を引き起こすか否かは今後の検討が待たれる。

著者らはCOが胆汁分泌の調節に関与していることを分離灌流肝モデルによりすでに明らかにしているが³⁾、さらにその作用機序を解明する目的で初代培養肝細胞を

用いて検討を行ったところ、肝細胞から産生される内因性のCOが、胆汁排泄空間である毛細胆管の収縮弛緩を調節していることを示した¹⁴⁾。毛細胆管は、律動的な収縮弛緩を繰り返すことが知られているが、HOの拮抗阻害剤であるZnPPを添加することにより内因性のCOの産生を抑制すると、毛細胆管の収縮間隔が短縮されることを明らかにした。また、ZnPPによって短縮された収縮間隔は、1 μMのCOを添加することにより回復されたことから、内因性に産生されるCOが毛細胆管収縮間隔の調節因子であることが明らかとなった。これらCOによる毛細胆管の収縮間隔の調節メカニズムは、cGMP非依存性であり、細胞内カルシウム濃度の調節、およびヘムタンパク酵素であり、定常状態でCO結合能を有する2価のヘム鉄を持つシトクロムP450の関与が示唆されているがその詳細なメカニズムについては現在のところ不明である。

おわりに

肝臓におけるCOによる類洞血管弛緩機序に関して、COの生成源、作用部位、NOとの量論的比較が明らかになりつつある。しかしながらsoluble guanylate cyclaseのみがCOの標的分子であるか否かは依然不明である。COは生体内で2価の鉄を持つヘム蛋白、酵素と結合ができる。今後COによる細胞内カルシウムの調節系の1つであるcytochrome P450-dependent eicosatrienoic acid epoxygenaseの活性調節が肝、腎などでの血管機能調節に関与するか否かが注目される。一方でCOの生理活性は局所でのNO生成量によって厳しく規制される。脳や精巣などheme oxygenase活性の高い他の臓器におけるCOの生理作用が確立されるためには、in vivo, in vitroにおける徹底したNO, COの量論比較が必要であることは言うまでもない。

近年、内毒素血症においてHO-1が動脈壁で誘導されること、ZnPP投与でshockに伴う血圧低下が抑制できることから誘導型HOの生成するCOが血管弛緩作用を発揮したとする論文が出された²⁴⁾。しかしながらこの報告ではZnPPがNO synthaseの抑制やguanylate cyclaseの抑制などheme oxygenaseの阻害作用以外の機序を介して血管抵抗の上昇を引き起こした可能性が十分に除外されていない。ZnPPにはsoluble guanylate cyclaseの抑制作用も知られている。HO-1から産生されたCOの作用を証明するためには、ZnPPによる昇圧効果が局所で生成される量に見合ったCOの添加により抑制可能であることを示す必要があり、これらの証明なくしてCOの関与は十分に証明しえないと考えられる。また肝類洞細胞培養系での経験から、HO-1のようなス

トレス蛋白の機能解析を培養系で行う場合、in vivoにおいて当該細胞が同様な蛋白発現をしているか否かを十分に検索して、実験成績の評価を行う必要があることは論を待たない。

文 献

- 1) Suematsu, M., Kashiwagi, S., Sano, T., Goda, N., Shinoda, Y., Ishimura, Y.: Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205(2): 1333-1337(1994)
- 2) Suematsu, M., Goda, N., Sano, T., Kashiwagi, S., Shinoda, Y., Ishimura, Y.: Carbon monoxide: An endogenous modulator of sinusoidal tone in perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, 96: 2431-2437(1995)
- 3) Sano, T., Shiomi, M., Wakabayashi, Y., Shinoda, Y., Doda, N., Yamaguchi, T., Nimura, Y., Ishimura, Y., Suematsu, M.: Endogenous carbon monoxide suppression stimulates bile acid-dependent biliary transport in perfused rat liver. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 272, G1268-G1275(1997)
- 4) Suematsu, M., Wakabayashi, Y., Ishimura, Y.: Gaseous monoxides: A novel regulator of microvascular function in the liver. *Cardiovasc. Res. (invited review)*, 32, 679-686(1996)
- 5) Shibahara, S., R. Müller, H. Taguchi, and T. Yoshida.: Cloning and expression of cDNA of rat heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 82: 7865-7869(1985)
- 6) Maines, M. D.: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.*, 2: 2557-2568(1988)
- 7) Ignarro, L. J., Barrot, B., Wood, K. S.: Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. *J. Biol. Chem.*, 259: 6201-6207(1984)
- 8) Wolff, D. J., Naddelman, R. A., Lubeskie, A., Saks, D. A.: Inhibition of nitric oxide synthase isoforms by porphyrins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 333: 27-34(1996)
- 9) Linden, D. J., Narasimhan, K., Gurfel, D.: Protoporphyrins modulate voltage-gated Ca current in AtT-20 pituitary cells. *J. Neurophys.*, 70: 2673-2677(1993)
- 10) Brune, B., Ullrich, V.: Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol. Pharmacol.*, 32: 497-504(1987)
- 11) Morita, T., Perrella, M. A., Lee, M. E. Kourembanas, S.: Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 92: 1475-1479(1995)
- 12) Kharitonov, V., Sharma, V. S., Pilz, R. B., Magde, D., Koesling, D.: Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 92: 2568-2571(1995)

- 13) Friebe, A., Schultz, G., Koesling, D. : Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J.*, 15 : 6863-6868(1996)
- 14) Shinoda, Y., Suematsu, M., Wakabayashi, Y., Goda, N., Suzuki, T., Saito, S., Yamaguchi, T., Ishimura, Y. : Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* in press.
- 15) Obolenskaya, M. Y., Vanin, A. F., Mordvintsev, P. I., Mulsch, A., Decker, K. : EPR evidence of nitric oxide production by the regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202 : 571-576(1994)
- 16) Misko, T. P., Schilling, R. J., Salvemini, D., Moore, W. M., Currie, M. G. : A fluorimetric assay for the measurements of nitrite in biological samples. *Analyt. Biochem.* 110 : 258-266
- 17) Bautista, A. P., Spitzer, J. J. : Inhibition of nitric oxide formation in vivo enhances superoxide release by the perfused liver. *Am. J. Physiol. (Gastrointest Liver Physiol.)*, 266 : G783-G788(1994)
- 18) Goda, N., Suzuki, K., Naito, M., Takeoka, S., Tsuchida, E., Ishimura, Y., Tamatani, T., Suematsu, M. : Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver : Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J. Clin. Invest.*, 101 : 604-612(1998)
- 19) Kashiwagi, S., Suematsu, M., Wakabayashi, Y., Kawada, N., Tachibana, M., Koizumi, A., Inoue, M., Ishimura, Y., Kaneko, A. : Electrophysiological characterization of cultured hepatic stellate cells in rats. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*, 272(35) : G742-G750(1997)
- 20) Poss, K. D., Thomas, M. J., Ebralidze, A. K., O'Dell, T. J., Tonegawa, S. : Hippocampal long-term potentiation is normal in heme oxygenase-2 mutant mice. *Neuron*, 15 : 867-873(1995)
- 21) Poss, K. D., Tonegawa, S. : Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 94 : 10919-10924(1997)
- 22) Zakhary, R., Poss, K. D., Jaffrey, S. R., Ferris, C. D., Tonegawa, S., Snyder, S. H. : Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 94 : 14848-14853(1997)
- 23) Farrugia, G., Irons, W. A., Rae, J. L., Sarr, M. G., Szurszewski, J. H. : Activation of whole cell currents in isolated human jejunal circular smooth muscle cells by carbon monoxide. *Am. J. Physiol.*, 264 : G1184-1189(1993)
- 24) Yet, S-F., Pellacani, A., Patterson, C., Tan, L., Folta, S. C., Foster, L., Lee, W-S., Hsieh, C-M., Perrella, M. A. : Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 272 : 4296-4301(1997)

特集

多機能分子NOによる生体制御と病態

ヘムオキシゲナーゼ-CO系による 臓器機能制御

末松 誠[†] 合田 巨人 鈴木 恒陽 若林 良之 石村 巽

ヘムの分解により一酸化炭素 (CO) と胆汁色素ビリベルジンを生成するヘムオキシゲナーゼには誘導型、構造型の2つのアイソザイムが存在する。肝臓ではわずか数cmH₂Oの圧勾配で微小循環血流が維持されているが、その低い血管抵抗を維持するためにCOの生成が必要不可欠であることが明らかとなった。

key words

ヘムオキシゲナーゼ, CO, 伊東細胞, cGMP

はじめに

Moncadaらにより、血管内皮由来の平滑筋弛緩因子 (内皮由来血管弛緩因子, endothelium-derived relaxing factor; EDRF) がL-アルギニン (L-Arg) から生成されるガス状メディエーター一酸化窒素 (NO) であることが発見されて以来¹⁾, NOは全身諸臓器の抵抗血管を能動的に弛緩させ血流を保持させるために不可欠な因子であると考えられてきた。しかしながら近年、筆者らは生体内で生成されるもう1つのガス状物質である一酸化炭素 (CO) が正常な肝臓で血管拡張物質として作用することを見いだした^{2), 3)}。肝臓の毛細血管に相当する類洞はわずか数cmH₂Oの圧格差で血流が維持されており、その血管抵抗は未知のメカニズムで恒常的に低く保たれていると考えられてきたが、内因性に生成されたCOがそのメカニズムを担っていると思われる。生体内でCOは、ヘム

分解の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase; HO) により生成されるが、HOの体内分布、COの標的分子についてはまだ十分な知見が得られていないのが現状である。本稿では、COの生理作用に関する研究の現況と問題点について概説する。

I. 内因性COの生成系:ヘムオキシゲナーゼ

生体内におけるCO生成のほとんどはHOによる。HOは、ヘムのポルフィリン環への酸素 (O₂) 添加反応により α -メテン炭素での開裂を起こし、同モルのCOと鉄 (Fe³⁺)-ビリベルジン (biliverdin) 錯体を生成する。これがNADPH-チトクロム P450 レダクターゼ (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH) により還元され、鉄とビリベルジンを生成する (図1)⁴⁾。ビリベルジンはビリベルジンレダクターゼによりビリルビン (bilirubin) となり、抱合されて胆汁中に排泄される。

Role of the Heme Oxygenase-CO System in Regulation of Organ Function

SUEMATSU Makoto, GODA Nobuhito, SUZUKI Tsuneharu, WAKABAYASHI Yoshiyuki & ISHIMURA Yuzuru
慶應義塾大学医学部 医化学教室

[†] E-mail: msuem@mc.med.keio.ac.jp

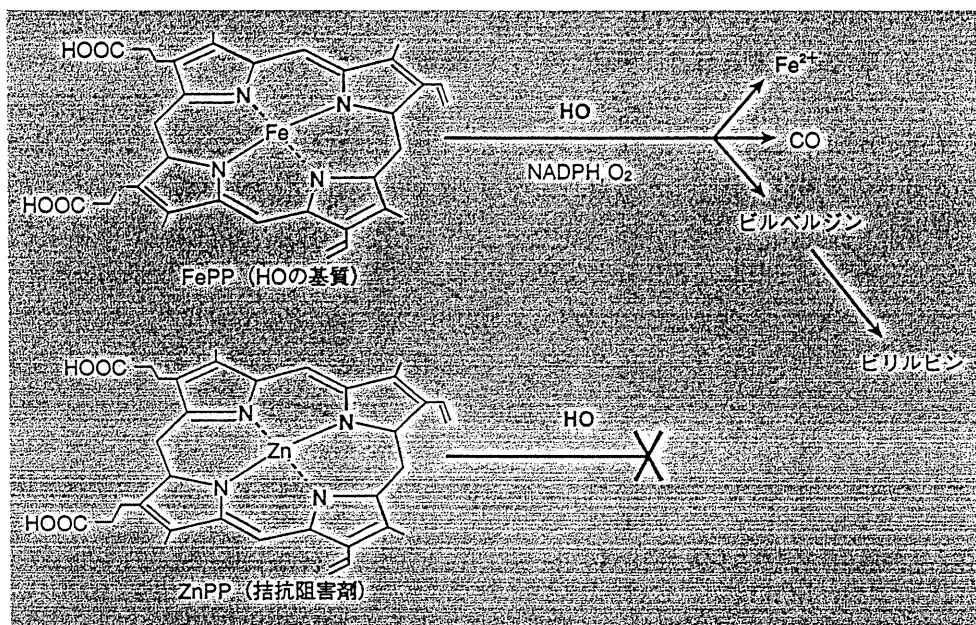


図1 ● ヘムオキシゲナーゼによるヘムの酸化的分解とCOの生成

ZnPP (zinc protoporphyrin IX) はヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase ;HO) の拮抗阻害剤であるが、種々のヘム酵素に対する直接の阻害効果も知られている。FePPは鉄プロトポルフィリン (プロトヘムIX) を示す。

表1 ● ヘムオキシゲナーゼアイソザイムの比較

	HO-1	HO-2
分子量	32kDa	36kDa
熱に対する感受性 (60℃, 10分処理での活性の喪失)	30%	80%
活性に必要なもの	O ₂ , NADPH, NADPH-チトクロムP450レダクターゼ	
プロトヘムIXのKm	0.24 μM	0.40 μM
誘導物質	ヘム, Hb, 低酸素 (hypoxia), オキダント, エンドトキシン, 熱ショック	?

HO ; heme oxygenase, NADPH ; reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, Hb ; hemoglobin.
Maines, M. D. : FASEB J. 2, 2557-2568 (1988) より転載.

HOにはストレス応答で誘導されるHO-1⁵⁾と、構成型のHO-2⁶⁾が知られている。HO-1遺伝子発現調節領域には低酸素反応領域 (hypoxia responsible element ; HRE), AP-1, NF-κB (nuclear factor-κB) などのドメインがあり、種々の生体侵襲に反応してタンパク質を発現する。これに対してHO-2は、発現誘導を起こす因子 (誘導物質, インデューサー) が報告されていない (表1)⁶⁾。HO活性の高い臓器としては脳, 脾臓, 肝臓があげられるが、脳や肝臓ではHO-2活性が優位であるのに対し、赤血球破壊の場であ

る脾臓ではHO-1が優位である⁶⁾。しかしながら、これらの臓器のどの細胞に2つのHOアイソザイムが発現しているかに関する知見は乏しく、各臓器におけるCOの生成動態も十分には検討されていない。

筆者らは最近、ラットのHO-1, HO-2の高発現細胞を樹立し、これらの細胞のミクロソーム画分をマウスに免疫し交叉反応を示さない抗ラットHO-1, HO-2モノクローナル抗体 (GTS-1, GTS-2) を作成した。これらの抗体を用いた免疫組織化学により、ラットの正常な肝臓では、HO-1が組織マクロファ-

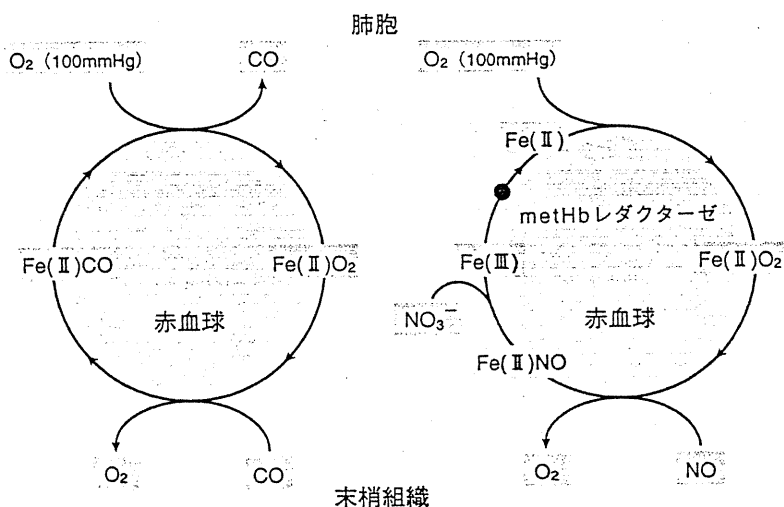


図2 ● 体内で生成されたCO, NOの運命

Fe(II), Fe(III)はそれぞれデオキシヘモグロビンとメトヘモグロビン(methemoglobin; metHb), Fe(II)O₂はオキシヘモグロビンを示す。COはFe(II)と比較的安定な複合体(ferrous-CO複合体)を形成し、血中を循環、徐々に肺胞で可逆的にO₂と置き換わり、気道に排泄される。NOはヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化するが、自らはNO₃⁻として尿中に排泄される。metHbは赤血球内の還元酵素metHbレダクターゼにより酸素運搬能をもつヘモグロビン(デオキシヘモグロビン)にリサイクルされる。

ジであるクッパー細胞に、HO-2が肝実質細胞に発現していることが示された⁴⁾。またHO-1は、エンドトキシン(endotoxin)で刺激を受けた肝臓で、クッパー細胞のみならず肝実質細胞にも発現が増強することが示された。

II. COによるグアニル酸シクラーゼの活性化: *in vivo*と*in vitro*の違い

COは、同じ低分子モノオキシドであるNO同様、グアニル酸シクラーゼ(guanylate cyclase; GC)を活性化することが種々の細胞で示されてきた^{3), 7)~9)}。しかしながら、精製酵素標品を用いた検討ではGCの感受性には大きな差があり、COによるGCの活性化はNOの約1/50と報告されている¹⁰⁾。したがって、生体局所でCOがNOに代わってGCを活性化するには、50倍以上の濃度が必要と考えられる。

一方、NOはラジカル分子のため、ヘモグロビン(hemoglobin; Hb)による除去もCOに比べ速やかで、NOのHbへの結合力はCOの約3000倍とされている。しかし、生体内での消去系となる赤血球のHbとの相互反応は大きく異なっている。すなわち、NOと結合した赤血球内の2価鉄(Fe²⁺)のHbは分解して硝酸イオン(NO₃⁻)とメトヘモグロビン

(methemoglobin; metHb)に変換し、metHbは還元されてもとのFe²⁺のHb(デオキシヘモグロビン)にリサイクルされるのに対し、COは一度Fe²⁺のHbに結合すると安定な複合体(ferrous-CO複合体)をつくり、肺のガス交換に際して酸素と可逆的に置き換わり、呼気中にそのままのかたちで排泄される点の特徴である。したがって、健康人の血中には通常約1~2%のHb-CO複合体(ferrous-CO複合体)が検出できる(図2)。

また、NOは非ヘム鉄やSH基との反応性も高いことが知られているが、COにはこれらの属性はみられない。さらに水溶液中での半減期が、桁はずれにCOのほうが長いことを考え合わせると、肝臓、脾臓のようなCO生成能が高いと思われる臓器でのcGMPを介したシグナル伝達をどちらのメディエーターがつかさどるかを量論的に議論する必要性が出てきた。肝臓では分離灌流系を用いて静脈灌流液中のNOやCOを実際に測定することが可能であり、近年、両者の量論的比較に基づいた機能調節の議論が急速に進みつつある。

NOとCOのGC活性化能の違いは*in vitro*における酵素の精製標品による検討であるがゆえに生じたも

のである可能性も最近示唆されている。Koeslingらはウシ肺から精製した酵素標品を用い、YC-1とよばれる抗血小板薬が酵素のCOによるcGMP生成能を100倍程度活性化することを報告した¹¹⁾。YC-1は生体内物質ではないが、もし細胞内にYC-1様のco-factorが存在すると仮定すると、細胞に添加したCOがcGMPを上昇させ、co-factorがはずれた精製酵素がCOに対して感受性が低い理由が説明できる。

Ⅲ. 肝におけるCOの生成とその生理学的意義

ラット分離灌流肝を用いた筆者らの検討で、正常灌流肝の肝静脈からのサンプルでは約0.1~0.4 μM のCOが遊離してくることがミオグロビンを用いた分光分析で明らかとなった^{2),3)}。これは流量にして約0.6nmol/分/g肝臓に相当する。肝臓におけるCO生成系は全体の約2/3が肝実質細胞に局在するといわれている。初代培養分離肝細胞を用いた検討では、約30nmol/時間/ 10^8 細胞のCOの生成が検出できた。これは、質重量1gに約 10^8 個の肝細胞が存在すると仮定すると約0.5nmol/分/g肝臓に相当することから、正常肝では肝細胞からのCOの生成が大部分を占めることになる^{7), 12), 13)}。また、HOはヘムを分解して同モルのビリベルジンとCOを生成し、ビリベルジンは同モルのビリルビンに変換されるため、COとビリルビンの生成量の量的関係はほぼ一致する。すなわち、肝微小循環系は肝実質細胞から遊離されたCOに常に曝露されていると考えられる。もちろんこれらは分離灌流系を用いた測定に基づく概算であり、生体内では類洞血流から供給される遊離ヘムや老廃赤血球由来のHbをクッパー細胞が代謝する可能性があり、CO生成はさらに増加すると思われる。

NOは最終代謝産物である NO_2^- 、 NO_3^- をGreiss法によって測定したり、スピントラップ剤で捕捉して電子スピン共鳴法 (electron spin resonance spectroscopy; ESR spectroscopy) で検出可能である。正常灌流モデルではGreiss法での検出感度以上の NO_x は検出できないが、DeckerらのグループのESR法による計測によれば、スピントラップ剤で直接捕捉できるNOの生成は約30pmol/分/g肝臓で、これが部分肝切除後に数倍に増加する¹⁴⁾。一方肝臓は、部分切除後あるいは内毒素投与後

には数十倍のNOを産生する。よってNOの局所における実効濃度は、BrassらによればLPS (lipopolysaccharide, 4mg/kg)をラットに投与すると数時間後には約1.3nmol/分/g肝臓のNOが検出可能となる¹⁵⁾。NOは酸素の存在下で速やかに NO_2^- に変換されるが、Miskoらは肝灌流モデルでの定常状態 (steady-state) での NO_2^- 生成をdiaminonaphthaleneを用いた蛍光法により評価している¹⁶⁾。これによると、肝静脈灌流液中の NO_2^- はただか0.1nmol/分/g肝臓程度である。したがって、局所におけるNOの実効濃度はCOのそれと比べて著しく低いと思われる。また、生成したNOは肝臓においておそらくクッパー細胞などで生成される O_2^- によって消去されることがSpitzerらのグループによって明らかにされた¹⁷⁾。よって、類洞周辺におけるcGMP上昇に関与するNO濃度は予想以上に低い可能性がある。

このように、*in vitro*ではNOはCOに比べてGCの活性化能が高いが、生体内の肝微小環境においてはCO濃度がNO濃度よりきわめて高いと考えられるため、肝臓におけるCOが循環制御調節因子としてより重要である可能性が示唆された。

Ⅳ. 肝局所でのCO生成部位と肝類洞収縮反応の調節メカニズム

肝臓において定常状態で生成されているCOは、HOの拮抗阻害剤であるZnPP (zinc protoporphyrin IX, 図1)を投与すると検出できなくなる。この状態での灌流肝は約30%の血管抵抗の増加を示すようになる。ここに約 $1\mu\text{M}$ のCOあるいは8Br-cGMPを投与すると灌流圧の上昇は抑制されたことから、内因性で生成されるCOが定常状態における肝血管抵抗の調節因子であることが示された^{2),3)}。この抑制要素が門脈血管でなく類洞血管であることを、生体顕微鏡下の肝微小循環観察法で調べることができる³⁾。この際、類洞は不連続性の収縮を示すが、収縮部位が血管周皮細胞である伊東細胞に一致した。類洞には平滑筋細胞は存在せず、周皮細胞が収縮要素として作用するわけだが、驚くべくことにL-NAME (*N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester) やアミノグアニジン (aminoguanidine) のようなNO合成酵素 (NO synthase; NOS) 阻害剤を1mM投与しても昇

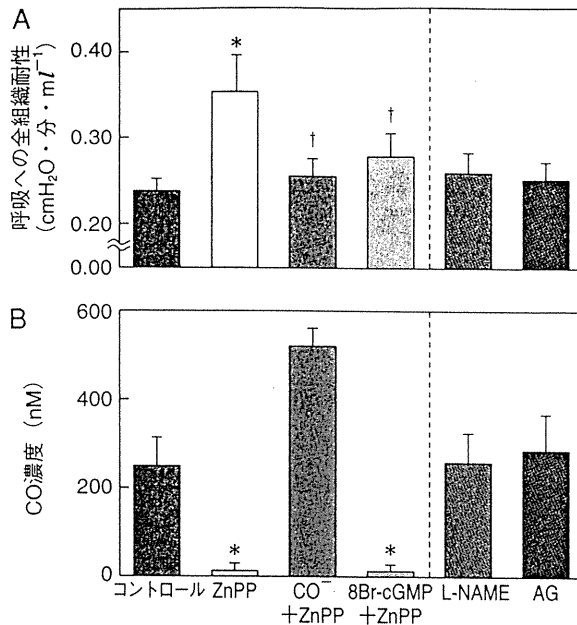


図3 ● ラット分離灌流肝におけるCOの生成と血管抵抗に対する各種薬剤の効果

AG; aminoguanidine, L-NAME; N^ω-nitro-L-arginine methyl ester, ZnPP; zinc protoporphyrin IX. *はコントロールに比して $p < 0.05$, †はZnPP群に対して $p < 0.05$ の有意差を示す. Suematsu, M. et al.: J. Clin. Invest. 96, 2431-2437 (1995) より転載.

圧反応が起こらない。以上のことから、NOは定常状態での肝血管抵抗の調節因子とは考えにくいと思われた(図3)。またこの類洞収縮反応は α_1 アゴニストである500nMのphenylephrineでは起こらない。このとき血管抵抗は約30%上昇するため、おもな収縮部位は肝臓の栄養大血管で類洞の上流に位置する門脈のレベルに起こると考えられる。

しかしながら、遊離金属プロトポルフィリンには多彩な薬理作用があることが知られており、ZnPPにも可溶性GC(soluble GC; sGC)の直接抑制作用¹⁸⁾、iNOS(inducible NOS)の抑制作用¹⁹⁾、電位依存性カルシウムチャンネル(voltage-dependent calcium channel)の活性化作用²⁰⁾などがあることが知られている。筆者らは、HOを抑制せずに肝臓内局所のCOをトラップする分子が、ZnPPでみられたような血管収縮作用を発揮するであろうと考え、NO、COを

もに捕捉するオキシヘモグロビン(oxyhemoglobin)と、NOは捕捉できるがCOとの結合が起こらないmetHb投与による血管反応の変化を検討した⁷⁾。正常な灌流肝のオキシヘモグロビンは血管抵抗の上昇と類洞の狭小化を起こすが、metHbではこれらの変化は起こらなかった。興味深いことに、オキシヘモグロビンを類洞内皮細胞の篩板状小孔(fenestration)を通過しない径約250nmのリボソームに封入し投与すると、血管抵抗の増加が起こらなくなった。これらの所見から、筆者らは肝実質細胞(HO-2を発現している)で生じたCOの一部が血液中のHbに捕捉されることなく類洞壁外周を取りまく伊東細胞に作用して同細胞のcGMPを上昇させることが、類洞血管抵抗を低く保つために必要不可欠であると結論した。

おわりに

COによる血管弛緩機序がcGMPの上昇のみで説明しきれない部分もあり、筆者らが最近、伊東細胞上にその存在を確認した外向き整流性K⁺チャンネル(outward rectifier K⁺ channel)²¹⁾などはCOによる膜電位の過分極作用を説明するうえで興味深いターゲットである。COは生体内でFe²⁺をもつヘムタンパク質、酵素と結合できるため、今後、COによるNOSやシクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase; COX)の活性調節などがおもしろい研究対象としてクローズアップされよう。一方、COの生理活性は局所でのNO生成量によって厳しく規制される。近年、内毒素血症においてHO-1が動脈壁で誘導されること、ZnPP投与でショックに伴う血圧低下が抑制できることから、誘導型HOの生成するCOが血管弛緩作用を発揮したとする論文が出された²²⁾。この報告では、ZnPPがNOSを抑制して圧を上げた可能性があるため、同じ部位でiNOSが発現しているかどうかを検証すると同時に、ZnPPによる昇圧効果が局所で生成される量に見あったCOの添加により抑制可能であることが証明されており、COの関与が十分に証明されていない典型例といえよう。その意味で、内因性COのメディエーターとしての関与を立証するためには厳密な量論的評価が必要であることはいうまでもない。

■ 文献 ■

- 1) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. & Moncada, S. : Nature 327, 524-526 (1987)
- 2) Suematsu, M., Kashiwagi, S., Sano, T. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 1333-1337 (1994)
- 3) Suematsu, M., Goda, N., Sano, T. et al. : J. Clin. Invest. 96, 2431-2437 (1995)
- 4) Suematsu, M., Wakabayashi, Y. & Ishimura, Y. : Cardiovasc. Res. 32, 679-686 (1996)
- 5) Shibahara, S., Müller, R., Taguchi, H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7865-7869 (1985)
- 6) Maines, M. D. : FASEB J. 2, 2557-2568 (1988)
- 7) Goda, N., Suzuki, K., Naito, M. et al. : J. Clin. Invest. (印刷中)
- 8) Brune, B. & Ullrich, V. : Mol. Pharmacol. 32, 497-504 (1987)
- 9) Rich, A. G., Farrugia, G. & Rae, J. L. : Am. J. Physiol. 267, C435-C442 (1994)
- 10) Kharitonov, V., Sharma, V. S., Pilz, R. B. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 2568-2571 (1995)
- 11) Friebe, A., Schultz, G. & Koesling, D. : EMBO J. 15, 6863-6868 (1996)
- 12) Yamaguchi, T., Wakabayashi, Y. M., Tanaka, T. et al. : Am. J. Physiol. 270, G1028-G1032 (1996)
- 13) Sano, T., Shiomi, M., Wakabayashi, Y. et al. : Am. J. Physiol. 272, G1268-G1275 (1997)
- 14) Obolenskaya, M. Y., Vanin, A. F., Mordvintsev, P. I. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 202, 571-576 (1994)
- 15) Ma, T. T., Ischiropoulos, H. & Brass, C. A. : Gastroenterology 108, 463-469 (1995)
- 16) Misko, T. P., Schilling, R. J., Salvemini, D. et al. : Anal. Biochem. 214, 11-16 (1993)
- 17) Bautista, A. P. & Spitzer, J. J. : Am. J. Physiol. 266, G783-G788 (1994)
- 18) Ignarro, L. J., Barrot, B. & Wood, K. S. : J. Biol. Chem. 259, 6201-6207 (1984)
- 19) Wolff, D. J., Naddelman, R. A., Lubeskie, A. et al. : Arch. Biochem. Biophys. 333, 27-34 (1996)
- 20) Linden, D. J., Narasimhan, K. & Gurfel, D. : J. Neurophys. 70, 2673-2677 (1993)
- 21) Kashiwagi, S., Suematsu, M., Wakabayashi, Y. et al. : Am. J. Physiol. 272, G742-G750 (1997)
- 22) Yet, S.-F., Pellacani, A., Patterson, C. et al. : J. Biol. Chem. 272, 4296-4301 (1997)

For Beginners

- ・ "Heme oxygenase : function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications"
Maines, M. D. : FASEB J. 2, 2557-2568 (1988)

● 「細胞工学」別冊 実験プロトコールシリーズ

好評発売中

活性酸素実験プロトコール

～測定法・遺伝子解析・病態生理モデル～

【監修】谷口直之 (大阪大学医学部生化学教授)

●B5判 336頁 ●本体価格4,500円+税

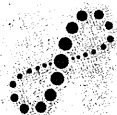
第1部 測定法

- 第1章 活性酸素の測定方法
- 第2章 活性酸素生成反応
- 第3章 活性酸素関連低分子化合物の測定法
- 第4章 活性酸素関連酵素およびタンパク質の測定法

第2部 遺伝子解析

- 第1章 活性酸素関連遺伝子発現調節の研究
- 第2章 活性酸素によるDNA傷害と修復

第3部 病態生理モデル実験法



秀潤社

〒106-0031 東京都港区西麻布4-15-21 第6興和ビル7階

TEL : 03-3409-6121 FAX : 03-5485-7715

E-mail : info@shujunsha.co.jp URL : http://www.shujunsha.co.jp/