

厚生省科学研究補助金（高度先端医療研究事業）
（総括）研究報告書

ピリドキシル化ポリオキシエチレン・ヘモグロビン重合体（PHP）
の摘出血管に対する作用に関する研究

主任研究者 西 勝英 熊本大学医学部薬理学第二講座 教授

研究要旨 本年度は従来ヘモグロビン分子の有するNO結合作用についてさらに検討を行うためPHPの摘出血管に対する作用を薬理的に検討した。化学修飾ヘモグロビンであるPHPはヘモグロビンに関する従来の報告と同様にin vitroの実験系でラットの大動脈におけるEDRF/NOを介する弛緩反応を未修飾のヘモグロビンと同程度に抑制することが明らかとなった。また、イヌ脳底動脈では直接的に血管を収縮させることが明らかとなった。また、予備実験で腸管平滑筋に対するアゴニスト刺激反応を抑制することが明らかとなり、さらにそのメカニズムについて検討をする予定である

A 研究目的

ヘモグロビンは摘出血管標本でEDRF/NOの作用を阻害すること報告されており、薬理的にはEDRF/NOの阻害剤として多くの実験で用いられている。PHPの臨床応用を考えた場合、ヘモグロビンの持つこの特性が心血管系へどのような影響を与えるかを検討しておくことは重要である。また、ヘモグロビンは脳底動脈や冠動脈を直接的に収縮させることが報告されており、クモ膜下出血後の血管攣縮の原因物質として考えられている。このようなヘモグロビンの多様な薬理的な作用に関して、ヘモグロビン系人工酸素運搬体（ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン重合体：PHP）であるPHPについても検討しておくことは必須であると思われる。そこで、PHPの摘出血管に対する作用を検討するとともに、PHPと化学修飾を行っていないヘモグロビンであるストローマフリーヘモグロビン（SFH）の摘出血管に対する作用を比較検討することにより、化学修飾による薬理的な作用への影響を検討した。

B. 研究方法

1. ラット摘出大動脈標本に対する作用

1.1 ラット胸部大動脈標本の作成

PHPの摘出血管に対する作用を検討した実験は、Martinらの方法に準じて行った¹⁻⁴。すなわち、SD系雄性ラット（350g～450g）をエーテ

ルで麻酔し、頸動静脈から脱血後ただちに開胸し、胸部大動脈を摘出した。血管の周囲の脂肪や結合組織を除去した後、2.5mm程度の中のリリングになるように切断し、内皮細胞存在（EC+）の条件下で実験する場合には、標本はただちに95%O₂、5%CO₂で通気し、37℃に保温したKrebs' solutionの入った10mlのバス中のL字型のフック（タングステン製）に2gの静止張力を負荷して懸垂した。内皮細胞非存在（EC-）の条件下で実験する場合には、プラスチック製のトレフチップを血管リングに挿入し、緩やかにこすることで内皮を機械的に除去したのち、上記と同じ浴槽内に懸垂した。内皮細胞の有無はフェニレフリン（Phe）10⁻⁶M添加による収縮時の10⁻⁶Mのアセチルコリン（ACh）による弛緩反応の有無で確認した。確認の際に、最大収縮に対して80%以上弛緩した標本のみをその後の実験に使用した。標本の安定化のため1時間放置し、その間、3～4回Krebs' solutionの交換を行なった。血管の張力は、アイソメトリックトランスデューサー（TS-611T、日本光電）およびプリアンプ（AP-620G、日本光電）を介し、ペンレコーダー（WJ-685G、日本光電）に記録した。

1.2 直接作用

PHPとPHPの製造中間体である精製SFHを、

10^{-8} ~ 10^{-5} Mのヘモグロビン濃度でラットの大動脈標本 ($n=5$) に累積的に添加し、大動脈に対する直接作用を検討した。張力の変化は50mM塩化カリウム (KCl) による収縮を100%とした相対値で検討した。

1.3 フェニレフリンまたは塩化カリウムによる収縮に対する作用

3×10^{-7} MのPheまたは30mMのKClで血管を収縮後、PHPと精製SFHを 10^{-6} または 10^{-5} M添加し、標本の張力の変化を記録した ($n=5$)。張力の変化は 3×10^{-7} MのPheによる収縮を100%とした相対値で示した。

1.4 アセチルコリンの弛緩反応に対する作用

Phe (3×10^{-7} M) で収縮後、EC+の標本にPHPまたは精製SFHを 10^{-5} M添加し、5分~10分後に 10^{-9} ~ 10^{-6} MのAChを累積的に添加した。AChの弛緩反応に対するPHPもしくは精製SFH存在の影響を検討した ($n=6$)。また、Phe収縮後、 10^{-9} ~ 10^{-5} MのPHP、精製SFHあるいはMet化PHPを5分~10分間前処置した後、ACh 10^{-6} Mによる弛緩反応に対する阻害作用を検討した ($n=4$)。PHP、精製SFHについては、ACh 10^{-6} Mによる弛緩に対する抑制の強さを比較するため、 IC_{50} 値を求めた。張力の変化は 3×10^{-7} MのPheによる収縮を100%とした相対値で示した。

1.5 L-Arginineの弛緩反応に対する作用

NOの生合成の基質であるL-Arginineによる弛緩に対するPHPの作用を検討した。EC+標本をPhe (3×10^{-7} M) で収縮後、PHPを 10^{-6} Mまたは 10^{-5} M添加し、その5分~10分後に 10^{-7} ~ 10^{-3} Mの濃度のL-Arginine (L-Arg) を累積的に添加した ($n=5$)。張力の変化は 3×10^{-7} MのPhe収縮後、PHPを加えたときの収縮を100%とした相対値で示した。

1.6 イソプロテレノールの弛緩反応への作用

AChによる内皮依存性弛緩反応とイソプロテレノール (Iso) による内皮非依存性弛緩反応に対するPHPとSFHの作用を比較した。EC+標本をPhe (3×10^{-7} M) で収縮後、 10^{-6} MのAChまたはIsoで弛緩させた。その後 10^{-8} ~ 10^{-5} MのPHPまたは精製SFHを累積的に添加し、AChまたはIsoによる弛緩反応へのPHPの影響を調べた ($n=5$)。張力の変化はAChまたはIsoによる弛緩反応を100%とする相対値で示した。グラフ上ではP H P、精製

SFH投与前値を0%として示した。

2. イヌ脳底動脈に対する作用

2.1 イヌ脳底動脈標本の作成

雄性ビーグル犬をペントバルビタール (30mg/kg, i.v.) で麻酔し、頸動静脈にカニューレを挿入した。100U/kgのヘパリンを静注した後、頸動脈カニューレより放血致死させた。死後ただちに頭蓋骨をはずし、脳を摘出し、脳底動脈 (A.Basilarlis) を摘出した。摘出した血管標本はラットの大動脈標本の場合と同様にチャンバー内に懸垂し、収縮反応をアイソメトリックトランスデューサー (TS-611T、日本光電) およびプリアンプ (AP-620G、日本光電) を介し、ペンレコーダー (WJ-685G、日本光電) に記録した。脳底動脈の場合の静止張力は1.5gとし、標本安定化のため90分間放置した。

2.2 直接作用

10^{-8} ~ 10^{-5} MのPHPまたは精製SFHを累積的にEC+、EC-の摘出脳底動脈標本に添加し、摘出脳底動脈標本に対する収縮作用を検討した ($n=4$)。張力の変化は50mM KClによる張力の変化に対する相対値で示した。

C. 研究結果

1. ラット摘出大動脈標本に対する作用

1.1 直接作用

10^{-8} ~ 10^{-5} MのPHPまたは精製SFHを、ラット摘出大動脈標本 ($n=5$) に累積的に添加したところ、EC+標本においてもEC-標本においても張力の有意な変化は認められなかった (図1)。

1.2 フェニレフリンまたは塩化カリウムによる収縮に対する作用

3×10^{-7} MのPheまたは30mMのKClで収縮させた標本に、PHPまたは精製SFHを添加したところ、いずれの場合も張力はさらに増加した。 (図2、3)

1.3 アセチルコリンの弛緩反応への作用

3×10^{-7} MのPheで収縮させた標本にPHPまたは精製SFHを 10^{-5} M添加すると、張力はさらに増加した。この標本に 10^{-9} ~ 10^{-6} MのAChを作用させたところ、AChによる弛緩反応は有意に抑制された (図4)。

ACh 10^{-6} Mによる弛緩反応はPHPまたは精製SFHにより収縮に転じた。ACh 10^{-6} Mによる弛緩

に対する抑制の強さを比較するために求めたIC₅₀は、PHPが 8×10^{-7} M、精製SFHが 2×10^{-7} Mで、精製SFHの方が4倍程度抑制作用が強かった。(図5)

1.4 L-Arginineの弛緩反応への作用

L-Arginineによる弛緩反応はPHP前処置で濃度依存的に抑制された。(図6)

1.5 イソプロテレノールの弛緩反応への作用

EC+標本においてAChによって弛緩させた大動脈標本は、PHPまたは精製SFHを添加することにより濃度依存的に収縮反応に転じた。また、EC-標本におけるIsoの弛緩反応は、PHPまたは精製

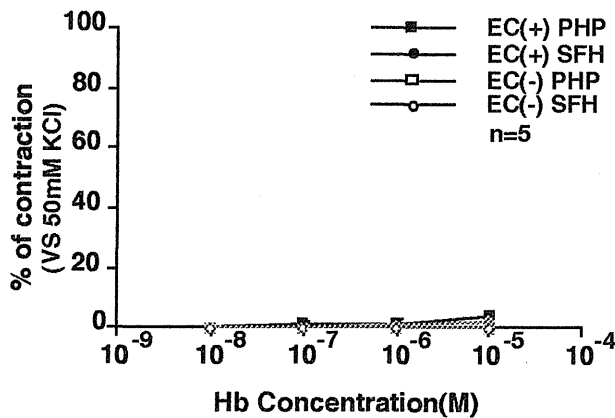


図1. PHP、SFHによる直接作用

SFHを添加してもほとんど変化しなかった(図7)。

2. イヌ摘出脳底動脈に対する作用

2.1 直接作用

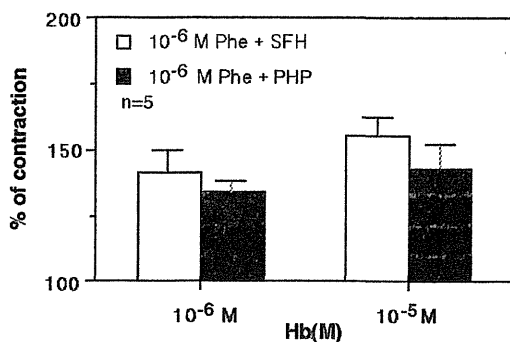


図2. ラット摘出大動脈におけるフェニレフリン収縮に対するPHP、SFH添加の影響

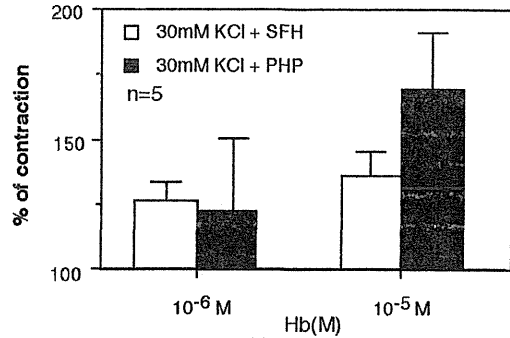


図3. ラット摘出大動脈におけるKCl収縮に対するPHP、SFH添加の影響

$10^{-8} \sim 10^{-5}$ MのPHPまたは精製SFHをイヌ摘出脳底動脈に累積的に添加したところ、EC+標本においては濃度依存的に収縮反応を示したが、EC-標本においては有意な変化は認められなかった(図8)。

D. 考察

ヘモグロビンとEDRF/NOとのin vitroにおける相互作用についてはMartinらによって薬理的に詳細に調べられている¹⁻⁴。Martinらはウサギやラットの大動脈を用いて、ヘモグロビンによるEDRF/NOの阻害作用の検討を行っており、ヘモグロビンはEDRF/NOを放出させて血管を弛緩させる薬物であるAChやA23187の作用さらにはNOを血管平滑筋内で産生するニトログ

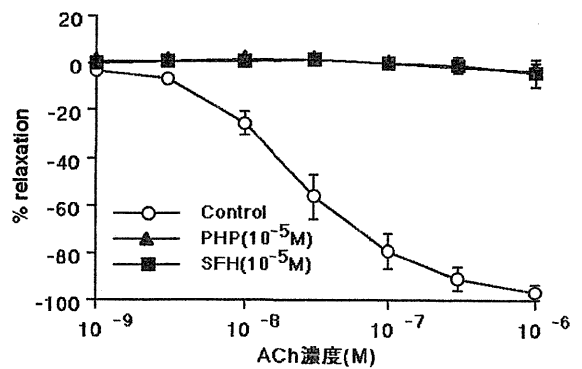


図4. PHP、SFHによるアセチルコリンの弛緩反応の阻害

リセリン (NG) の作用を阻害すると報告している¹。EDRF/NOによる血管平滑筋弛緩の機序は、EDRF/NOが血管平滑筋細胞内の可溶性のGuanylate Cyclase (sGC) のヘム蛋白の部分に結合することでsGCを活性化し、cGMP濃度を増加さ

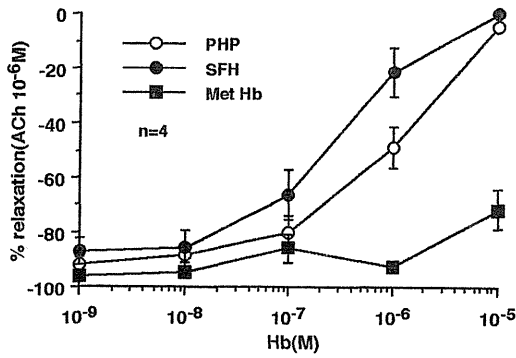


図5. PHP、SFH、Met-Hb 処置時のアセチルコリンによる収縮反応

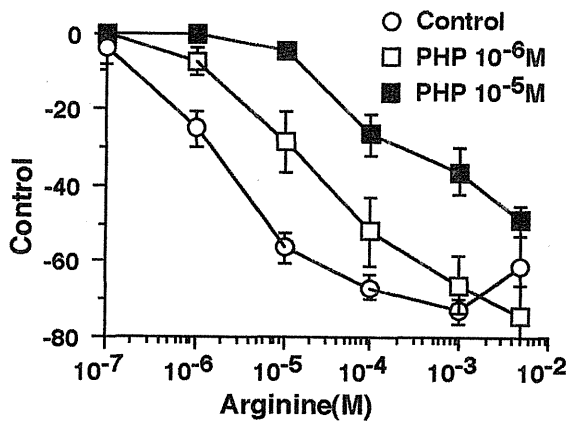


図6. PHP の Arginine による弛緩反応の阻害

せることによると考えられている^{7~11}。そのため、ヘモグロビンはAChやNGのようにNOを介したcGMP濃度の増加による弛緩反応は阻害するが、IsoのようにNOを介さないcAMPの増加により弛緩反応を起こす薬物の作用は阻害しない¹。今回の我々の実験でも、PHPや精製SFHでAChの弛緩反応は阻害されたが、Isoの弛緩反応は阻害されな

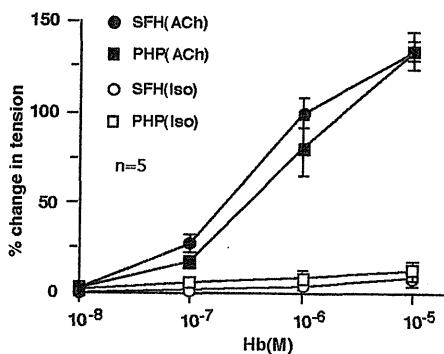


図7. アセチルコリン、イソプロテレノールの弛緩反応に対するPHP、SFHの影響

かった。このことは、PHPや精製SFHによるAChの弛緩反応の阻害は、Martinらのヘモグロビンの実験と同様に、AChにより放出されるEDRF/NOの作用を阻害することで起きていていると考えられる。PHPや精製SFHによるEDRF/NOの阻害作用も、EDRF/NOとヘモグロビンの結合により、EDRF/NOが血管平滑筋内のsGCに作用できなくなるために起きていていると考えられている¹。Martinらの実験では、ヘモグロビンと同じferrous

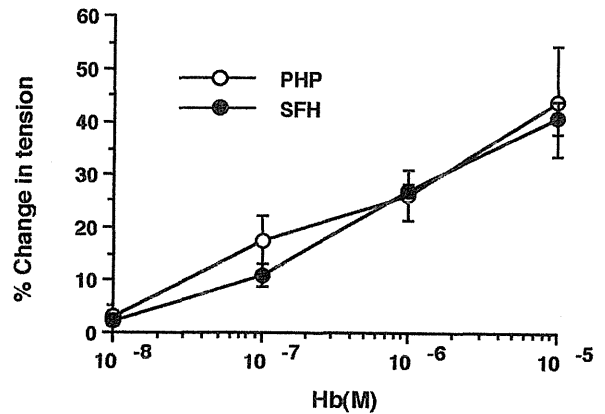


図8. イヌ脳底動脈におけるPHP、SFHによる収縮の用量反応曲線

hemoproteinであるミオグロビンでもEDRF/NOの阻害が起こる事、Met化したヘモグロビンやミオグロビンなどferric hemoproteinではEDRF/NOの阻害作用はほとんど起こさなかった事などから、Met化したヘモグロビンやミオグロビンではEDRF/NOとの親和性が失われるため、EDRF/NOの阻害作用がほとんど起こらなくなると考えている。今回の我々の実験の結果でも、Met-PHPではAChの弛緩反応は阻害されなかった。このことも、PHPや精製SFHによるAChの弛緩反応の阻害がAChにより放出されるEDRF/NOの阻害によるものであること示唆している。

内皮細胞から放出されるEDRF/NOは、ノルエピネフリン (NE) やPheによる収縮反応を抑制しているといわれている⁴。このことは、内皮細胞を除去したりヘモグロビンを処置したりすると、NEやPheによる収縮反応が増強されることで証明されている。今回の我々の実験でも、PheやKClで収縮させた標本にさらにPHP、精製SFHを処置すると、収縮が増強された。このことは、PheやKClによる収縮時には内皮細胞からEDRF/NOが放出されて収縮を抑制しており、PHPや精製SFHはこの抑制を取り除いてしまうため、収縮をさらに増強すると思われる。EDRF/NOの放出には、AChや

A23187等の薬物による放出以外に血流による刺激や交感神経系の緊張などが影響するといわれている^{12, 13}。今回の実験では、PHPも精製SFHも直接的にはラット大動脈標本をほとんど収縮させなかった。このことから、in vitroの摘出血管の状態では血流による刺激も交感神経系の緊張もほとんどないため、ベースなEDRF/NOの放出はほとんどないと考えられる。そのため、PHPや精製SFHだけを加えても、PHPや精製SFHによるEDRF/NOの阻害がほとんどおこらないため、直接的に大動脈を収縮させることがなかったと思われる。

EDRFの本体は、生物学的、化学的性質が似ていること^{14, 15}から、一酸化窒素 (NO: Nitric Oxide) であろうと報告されていたが^{16, 17}、1988年、Palmerらは¹⁵Nを用いてL-ArginineのGuanidino窒素からNOが生合成されることを示した¹⁸。1991年には、以前よりその存在が想定されていたL-ArginineからNOを合成する際に必要とされるNO合成酵素が、ラット小脳より抽出された¹⁹。この酵素はその後血管内皮細胞からも抽出され²⁰、EDRF/NOは血管内皮細胞でもL-Arginineを基質として産生され、血管平滑筋に作用して平滑筋の弛緩をもたらすことが明らかとなった。今回の結果では、PHPや精製SFH処置によりPhe収縮をかけた標本のL-Arginineによる弛緩反応は抑制された。これは、PHP、精製SFHがL-Arginineより生合成されるEDRF/NOの作用を阻害するためであると考えられる。

PHPでは、ピリドキサル化により、酸素に対する親和性が精製SFHに比べて低くなっている (P50: 20mmHg (PHP) vs 14mmHg (SFH))。NOがO₂と同様の親和性を示すとすると、PHPと精製SFHでは親和性の違いからEDRF/NOの阻害作用に違いが生じる可能性がある。今回の実験の結果では、IC₅₀値はSFHが 2×10^{-7} M、PHPが 8×10^{-7} Mで、SFHの阻害作用がやや強い傾向にあり、親和性の違いを反映した結果かもしれない。Met-PHPでも 10^{-5} MでEDRF/NOの作用を30%程度抑制したが、これはバス中でMet-PHPが還元され、それが作用したもの、もしくは、NOによりMet-PHPが還元されてPHPとなつて阻害作用を示したためと考えられる。

もう一つのヘモグロビンの薬理学的作用として、ヘモグロビンは脳底動脈を直接的に収縮させることが報告されており⁵⁻⁷、クモ膜下出血後の脳血管の攣縮にヘモグロビンなどの血液成分が関与しているといわれている²¹⁻²³。このヘモグロビンによる収縮は、脳底動脈における内皮依存性弛緩

反応の阻害によるものであるという報告や²⁴⁻²⁶、ヘモグロビンによる内皮細胞での収縮系のプロスタグランジン (PG) の産生が主な原因であるという報告²⁷⁻²⁹があり、その明確な機序は明らかにはなっていない。今回のPHPの直接作用に対する検討では、イヌの脳底動脈ではPHP、精製SFHともに直接的な収縮作用が認められた。この収縮の原因に関しては、今回の検討だけではわからないが、ヘモグロビンの脳底動脈に対する作用として知られている直接的な収縮作用をPHPや精製SFHが同様に保持していることが示唆された。今回のin vitroでの実験により、ヘモグロビンの薬理学的作用として知られているEDRF/NOの作用の阻害や脳底動脈における直接的な収縮作用を、PHPと精製SFHも持っていることが示された。

E. 結論

- PHPおよび精製SFHはラットの大動脈においてEDRF/NOの作用を抑制する。
- EDRF/NOの作用の抑制の程度はPHPと精製SFHでほとんど同じであった。
- PHPおよび精製SFHはイヌの脳底動脈を直接的に収縮させた。

引用文献

- 1) Martin, W., Villani, G.M., Jothianandan, D., and Furchgott, R.F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 232 708-716 1985
- 2) Martin, W., Villani, G.M., Jothianandan, D., and Furchgott, R.F. Blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta by certain ferrous hemoprotein. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 233 679-685 1985
- 3) Martin, W., Furchgott, R.F., Villani, G.M., and Jothianandan, D. Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 237 539-547 1986
- 4) Martin, W., Furchgott, R.F., Villani, G.M., Jothianandan, D. Depression of contractile

- responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 237 529-538 1986
- 5) Tanishima, T. Cerebral vasospasm: contractile activity of hemoglobin in isolated canine basilar arteries. *J.Neurosurg.* 53 787-793 1980
- 6) Wellum, G.R., Irvine, Jr., T.W., and Zervas, N.T. Dose responses of cerebral arteries of the dog, rabbit, and man to human hemoglobin in vitro. *J.Neurosurg.* 53 486-490 1980
- 7) Wellum, G.R., Irvine, Jr., T.W., and Zervas, N.T. Cerebral vasoactivity of heme proteins in vitro : Some mechanistic considerations. *J.Neurosurg.* 56 777-783 1982
- 8) Rappaport, R.M., and Murad, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ.Res.* 52 352-357 1983
- 9) Forstermann, U., Mulsch, A., Bohme, E., and Busse, R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ.Res.* 58 531-538 1986
- 10) Ignarro, L.J., Harbison, R.G., Wood, K.S., and Kadowitz, P.J. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein. :Stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 237 893-900 1986
- 11) Mulsch, A., Bohme, E., and Busse, R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells. *Eur.J.Pharmacol.* 135 247-250 1987
- 12) Rubanyi, G.M., Romero, J.C., and Vanhoutte, P.M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am.J.Physiol.* 250 H1145-H1149 1986
- 13) Lacolley, P.J., Lewis, S.J., and Brody, M.J. Role of sympathetic nerve activity in the generation of vascular nitric oxide in urethane-anesthetized rats. *Hypertension* 17 881-887 1991
- 14) Hutchinson, P.J.A., Palmer, R.M.J., and Moncada, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. *Eur.J.Pharmacol.* 141 445-451 1987
- 15) Ignarro, L.J., Byrks, R.E., Buga, G.M. and Wood, K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical. *Circ.Res.* 61 866-879 1987
- 16) Furchgott, R.F., Khan, M.T., and Jothianandan, D. Comparison of endothelium-dependent relaxation and nitric oxide-induced relaxation in rabbit aorta. *Fed.Proc.* 46 385 1987
- 17) Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 524-527 1987
- 18) Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., and Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333 664-666 1988
- 19) Brecht, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. and Synder, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351 714-9 1991
- 20) 江角 浩安 NO合成酵素の構造とその働き *実験医学* 18 27-31 1993
- 21) Nozaki, K., Okamoto, S., Yamamoto, H., and Kikuchi, H. Red blood cells are essential for late vasospasm following experimentally induced subarachnoid hemorrhage in dogs. *Neurol.Med.Chir.* 30 10-15 1990
- 22) Miao, F.J.-P., and Lee, T.J.-F. Effects of bilirubin on cerebral arterial tone in vitro. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 9 666-674 1989
- 23) Kanamaru, K., Waga, S., Kojima, T., Fujimoto, K., and Niwa, S. Endothelium-dependent relaxation of canine basilar arteries. *Stroke* 18 938-949 1987
- 24) Fujiwara, S., Kassell, N.F., Sasaki, T., Nakagomi, T., Lehman, R.M. Selective hemoglobin inhibition of endothelium-dependent vasodilation of rabbit basilar artery. *J.Neurosurg.* 64 445-452 1986
- 25) Toda, N. Hemolysate inhibits cerebral artery relaxation. *J.Cereb.Blood Flow Met.* 8

46-53 1988

- 26) Onoue, H., Nakamura, N. and Toda, N. Prolonged exposure to oxyhemoglobin modifies the response of isolated dog middle cerebral arteries to vasoactive substances. *Stroke* 20 657-663 1989
- 27) Okamoto, S., Handa, H. and Toda, N. Role of intrinsic arachidonate metabolites in the vascular action of erythrocyte breakdown products. *Stroke* 15 60-64 1984
- 28) Toda, N. Mechanisms of constricting action of oxyhemoglobin in isolated monkey and dog cerebral arteries. *Am.J.Physiol.* 258 H57-H63 1990
- 29) Toda, N., Kawakami, M., and Yoshida, K. Constrictor action of oxyhemoglobin in monkey and dog basilar artery in vivo and in vitro. *Am.J.Physiol.* 260 H420-H425 1991

研究中途経過報告

(1) 小腸の自動収縮に対するPHP作用

腸管（小腸）平滑筋収縮の自動収縮に対するPHPの作用を収縮の振幅と頻度を指標として検討した結果、PHP濃度が1g/dlまでは腸管平滑筋収縮の振幅・頻度に有為な変化を生じなかった。PHP濃度が3g/dlの時、収縮の頻度に対する影響は生じなかったが振幅はコントロール時の約75%に減少した。PHP濃度が6g/dlの時、収縮の振幅はコントロール時の約50%そして頻度はコントロール時の約70%に減少した。PHPにより抑制された腸管平滑筋の収縮の振幅と頻度はどちらも標準外液で再灌流すると一定の潜時の後、コントロールの値にまで回復した。1g/dlまでのPHP濃度において有為差は認められなかったが平滑筋収縮の振幅にわずかな増加を生じた。これは、従来報告されているPHPのNOと強く結合する性質のために腸管平滑筋の弛緩が阻害されたために生じた可能性が考えられる。

(2) アゴニストによって惹起される収縮に対するPHP作用

腸管平滑筋収縮のアゴニストとしてアセチルコリン (ACh)、プロスタグランジンF2 α とE1 (PGF2 α とPGE1)そしてブラジキニン (BK)を用いて検討した。全薬品投与により用量依存性収縮応答が記録された。PHPの濃度は(1)の実験で腸管の自動収縮抑制作用のあった3g/dlと6g/dlを用いた。各々のアゴニストで惹起される最大収縮をコントロールとして、それらの収縮に対するPHPの作用を比較検討した。PHP濃度3g/dlの時、ACh投与による最大収縮はコントロールの収縮張力とほぼ同じであったのに対し、PGF2 α 、PGE1そしてBK投与によって惹起される収縮は顕著に抑制され各々コントロールの約50%に減少した。PHP濃度が6g/dlの時、ACh投与による最大収縮はコントロール時の約70%に減少し、PGF2 α 、PGE1そしてBK投与によって惹起される収縮は各々コントロール時の約20%にまで減少した。以上より、PHPによるAChと他の3種 (PGF2 α 、PGE1そしてBK)によって惹起される収縮張力の抑制作用の過程に違いがあることが示唆された。

PHPの自動収縮およびアゴニストによって惹起される収縮に対する抑制作用はPHPのCa²⁺のキレート作用やCa²⁺チャネル阻害そしてヘモグロビン分子自体が酸化ストレスとして作用するため腸管収縮運動阻害を起こしている可能性が考えられる。今年度中に、現在開発中の新規化学修飾ヘモグロビン・ α -1糖蛋白結合体PHP- α -1 AGP (従来のPHPをニトロソ化し過剰な過酸化由来の毒性を軽減した新規ヘモグロビン)を用いた実験に着手し、当実験結果と比較検討する予定である。

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

PHP-a₁AGのニトロソ化製剤の作製

分担研究者 前田 浩 熊本大学医学部微生物学教室 教授

研究要旨：本年度は、PHPをはじめとする人工ヘモグロビンの臨床応用に際して問題となるヘモグロビンによる内因性平滑筋弛緩因子の消去・阻害活性を改善させるため、まず、各種蛋白のニトロソ化法およびニトロソ蛋白の分析法を確立した。このため、high performance liquid chromatography (HPLC) にHgCl₂とGriess試薬の混合液よりなるflow reactorシステムをカップルさせた。このことにより、蛋白のニトロソ化を簡便に評価できるようになった。さらに、蛋白のニトロソ化の効率を各種ヘモグロビンを含むSH含有蛋白について検討した。その結果、イソアミルナイトライトおよびニトロソグルタチオンを蛋白のニトロソ化剤として用いることにより、蛋白の機能を損なうことなく、各種ニトロソ化蛋白を作製できることがわかった。また、この様なニトロソ化蛋白は、この分子内にNO（ニトウムイオン、NO⁺）を安定に保持しており、生体内において強い血管拡張作用と血流維持作用を発揮した。このことは、PHPをニトロソ化することで、ヘモグロビンによる血管収縮、血液低下などの副作用を改善させ、より安全な人工酸素運搬体の開発が可能であることを示している。

A. 研究目的

一酸化窒素（nitric oxide, NO）は内因性血管弛緩因子として機能しており、主要臓器の血流維持作用を発揮している。PHPをはじめとする人工ヘモグロビンは、人工酸素運搬体として、その臨床応用が期待される。しかしながら、ヘモグロビンは生体内のNOの最も強力な消去剤であり、PHPなどを血管内に多量、かつ長期にわたり投与した場合、血管弛緩因子としてのNOの機能が損なわれ、主要臓器に虚血性ストレスを与えることが危惧される。一応、近年生体内で生じたNOは、その一部が蛋白や低分子のチオール残基とニトロソ化付加体を形成し、その機能を発揮していることが指摘されている。そこで、本分担研究においては、PHPに血球潤滑剤として、a₁-AGを添加し、さらにこれらをニトロソ化することで、ヘモグロビンの欠点である血流阻害作用やoxidant作用などの副作用を軽減する試みを行う。

B. 研究方法

1. ニトロソ化蛋白の検出・定量法の確立

まず、各種ニトロソ化蛋白をHPLC法により分離し、HPLCに連続的に接続したflow reactor中で、Hg²⁺イオンとニトロソ化蛋白を反応させることにより、ニトロソ基を分解し、生じる亜硝酸イオン（NO₂⁻）をGriess試薬を用いてflow reactor中で検出した。図1にHPLC-flow reactorのプロダイアグラムを示す。

2. 各種SH含有蛋白質のニトロソ化

蛋白のニトロソ化は、ニトロソ化試薬として良く知られるイソアミルナイトライトと、低分子のニトロソ化合物であるニトロソグルタチオンを用いて、リン酸緩衝液中（pH 7.8）で行った。

3. ニトロソ化蛋白の薬理活性

ニトロソ化蛋白が内因性のNOと同様、血管平滑筋に対して弛緩作用を有することを確認するため、ウサギの胸部大動脈リング標本を用いて、血管弛緩作用について検討した。

さらに、臓器血流の改善作用について、ラット肝の虚血再灌流障害モデルを用いて解析した。

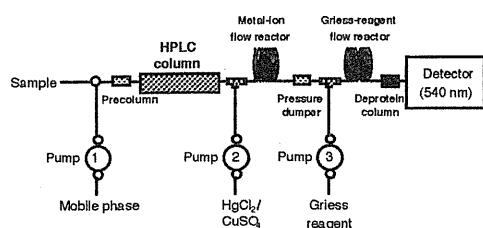


図1. ニトロソ蛋白分析システム (HPLC-flow reactor) のフローダイアグラム

C. 研究結果

今回開発したHPLC-flow reactor法により、ニトロソ化蛋白を高感度 (> 10 nM) かつ特異的に検出定量できることがわかった。

SH含有蛋白として、ヒトアルブミン、 α_1 -プロテアーゼインヒビター (α_1 -PI)、ヘモグロビンをニトロソ化剤およびニトロソグルタチオンを用いてニトロソ化した。その結果、いずれの蛋白も変性・分解などをきたすことなく効率良くニトロソ化されることがわかった。特に、ヘモグロビンに関しては、ニトロソグルタチオンを用いることにより、ヘム鉄がメト化 (酸化) することなくニトロソ化され、また、それぞれの蛋白中のニトロソ基は安定で、NOも良好に保持されていた。

さらに、ニトロソ化蛋白が強い血管平滑筋弛緩作用を発揮し、ラットの肝虚血再灌流障害においても、著明な血流改善作用を示した。

D. 考察

NOは生体内において、その強い血管拡張作用を介して主要臓器の血流維持に深く関わっている。また最近では、NO由来のニトロソ化蛋白が、生体内で抗アポトーシス、抗酸化能を発揮することにより、臓器保護作用を発揮していることも示唆されている。

PHPなどの人工ヘモグロビン製剤は、NO阻害活性やヘム鉄による生体への酸化ストレス誘発することが予想される。従って、PHPを酸素運搬体として開発する上で、これらの問題を解決する方策を模索することは、大変重要なことであると思われる。今回、PHPをニトロソ化することで、ヘモグロビンの有するこれらの欠点を補ったより安全性の高い製剤の開発の可能性が示唆された。

E. 結論

PHPをニトロソ化することで、ヘモグロビンに

よる血管収縮、血液低下などの副作用を改善させ、より安定な人工酸素運搬体の開発が可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Akaike, K. Inoue, T. Okamoto, H. Nishino, M. Otagiri, S. Fujii and H. Maeda: Nanomolar quantification and identification of various nitrosothiols by high performance liquid chromatography coupled with flow reactors of metals and Griess reagent. *J. Biochem.*, 122: 459-466 (1997).
2. M. Yoshida, T. Akaike, S. Goto, W. Takahashi, A. Inadome, M. Yono, H. Seshita, H. Maeda and S. Ueda: Effect of the NO scavenger carboxy-PTIO on endothelium-dependent vasorelaxation of various blood vessels from rabbits. *Life Sciences*, 62: 203-211 (1998).
3. M. Yoshida, T. Akaike, A. Inadome, W. Takahashi, H. Seshita, M. Yono, S. Goto, H. Maeda and S. Ueda: The possible effect of nitric oxide on relaxation and noradrenaline release in the isolated rabbit urethra. *Eur. J. Pharmacol.*, 7: 213-219 (1998).
4. K. Inoue, T. Akaike, Y. Miyamoto, T. Sawa, M. Otagiri, S. Suzuki, T. Yoshimura and H. Maeda: Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.*, (in press) (1999).

2. 学会発表

1. Y. Miyamoto, T. Akaike, K. Inoue, M. Yoshida, T. Hamamoto, T. Sawa and H. Maeda: Antimicrobial function of α_1 -protease inhibitor through its S-nitrosylation. 3rd International Conference \times Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide, July 11-15, 1998 (UCLA, CA, USA).
2. K. Inoue, T. Akaike, M. Otagiri and H. Maeda: Metal-catalyzed generation of S-nitrosoglutathione. 3rd International Conference \times Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide, July 11-15, 1998

(UCLA, CA, USA).

3. 宮本洋一、赤池孝章、井上勝央、吉田正貴、濱本高義、池邊宗三人、前田 宏： α_1 -プロテアーゼインヒビターのS-ニトロソ化による抗菌活性発現. 第71回日本生化学会大会, 平成10年10月14日~17日 (名古屋).
4. 井上勝央、赤池孝章、宮本洋一、小田切優樹、前田 浩：セルロプラスミンによるニトロソチオール生成反応の解析. 第71回日本生化学会大会, 平成10年10月14日~17日 (名古屋).
5. 池邊宗三人、赤池孝章、小川道雄、前田浩：肝虚血再灌流障害におけるNOの役割. 第71回日本生化学会大会, 平成10年10月14日~17日 (名古屋).

厚生省科学研究補助金（高度先端医療事業）

（分担）研究報告書

人工血液を用いた臓器保存液に関する研究

分担研究者 北村 信夫 熊本大学医学部外科学第一講座 教授

研究要旨 従来の心筋保護液の限界および使用上の制限を打破するためには、晶質性と血液性心筋保護液両者の特性、すなわち好氣的代謝を促し、かつ、低温にできる心筋保護液を開発する必要があると考えた。今回我々は人工血液（修飾ヘモグロビン）に着目し、心筋保護液として用いることを考案した。この人工血液は、ピリドキサーリン酸でヘモグロビンを修飾することで、フリーヘモグロビンの特徴である高酸素親和性を解決し、組織での酸素放出を可能にしているほか、4℃においても中等度冷却血液（20℃）と同等の粘度しか有さないため低温で使用できると考えられる。また、血液型がなく臨床的に使用しやすい特徴がある。

本研究では、この人工血液性心筋保護液を動物実験で使用し、その安全性と長時間心停止後の心機能回復を明らかにしていきたいと考えている。

本研究は、臨床的に重大な問題である長時間開心術後の低心拍出量症候群の発生予防や早期心機能回復により、手術成績の向上のみならず、術後の医療費削減にも貢献するものと考えられる。長時間、安全に心停止を得られる心筋保護液の開発は、複雑心奇形・連合弁膜症・冠状動脈多枝バイパス術をはじめとする、長時間開心術の手術成績を飛躍的に向上させるだけでなく、高度低心機能症例の開心術においても術後の心機能保持に有用と考えられる。

研究方法および計画

（研究方法）

すべての実験は、熊本大学医学部附属動物実験施設で行う。対象動物には犬を使用し、橈骨動脈の内皮細胞機能は、アセチルコリンに対する血管弛緩反応を利用して評価する。アセチルコリンは内皮細胞のレセプターと結合し、EDRF (NO) の産生を増加させ血管平滑筋を弛緩させることが知られているが、血管が弛緩し、かつ血圧が保たれていればその血流量は増加する。橈骨動脈の末梢側に電磁流量計を置き、中枢側からアセチルコリン溶液を注入し血流量の変化を測定すれば、間接的にその内皮細胞機能を知ることができると考えられる。我々は、腹部大動脈瘤手術時に大動脈遮断前、遮断後で外腸骨動脈血流量を測定し、それがアセチルコリン注入により変化することを確認し

ており、アセチルコリン注入法が安全かつ有用であることを知っている。以上のことから、橈骨動脈の剥離前・後にアセチルコリンに対する血流量の変化を測定することで、剥離操作に伴う内皮細胞の機能変化を評価することができる。

また、切除・遊離した橈骨動脈グラフトは直ちに保存液に浸し、バイパス術施行直前まで保存した後、予め100 mmHgの圧となるように高さを調節した生理溶液をグラフトの中枢側断端に連結し、末梢側断端からの流量を計測する。ここでもアセチルコリンの注入前・後の流量を比較し、保存に伴う内皮細胞の機能変化を評価する。さらに、動脈切片の病理組織学的検討も行い、内皮保存の状況についても検討を加えると同時に、動脈リングを用いてその保存後の機能を経時的に解析する。保存液は、血液成分を使ったものから使わないものまで数種類を予定し、その至適成分および至適温度について検討する。

当研究では、内胸動脈が遊離グラフトとして使用される場合、上述した方法でその内皮細胞機能を評価し橈骨動脈グラフトと比較検討することで、グラフト採取部位による攣縮性の違いについても言及したい。

（研究計画）

初年度は、橈骨動脈剥離前・後のアセチルコリンに対する血流量の変化を確認しつつ、手術手技

および研究手技を向上させ、また上述した方法を用いて保存液の至適条件を決定する。さらに、動脈硬化のリスクファクター（高脂血症、タバコ、糖尿病）や術前心機能と術中の血管内皮細胞機能とを比較検討し、橈骨動脈グラフトの各病態における特性を明らかにする。

次年度以降は、至適保存液を利用した臨床例を積み重ね、術中のグラフト血管内皮細胞機能と術後（周術期および遠隔期）の開存率とを詳細に分析し、その因果関係を明らかにするとともに、治療上の参考にしてほしい。

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

ANNUAL REPORT
OF THE DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FOR THE YEAR 1957

CHICAGO, ILLINOIS
1958

