

琉球大学学術リポジトリ

[原著]同種グロビンの輸液応用：1. Amino acid
および globinpheresis
に伴う血清膠質参透圧,血清アミノ酸の変動および免
疫学的検討

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学保健学部 公開日: 2014-07-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中田, 福市, 上江洲, 典子, 前平, 房子, 宮城, 研, Nakada, Fukuichi, Uezu, Noriko, Maehara, Fusako, Miyagi, Ken メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016495

同種グロビンの輸液応用

1. Amino acid および globinphoresis に伴う血清膠質 滲透圧, 血清アミノ酸の変動および免疫学的検討

琉球大学保健学部生化学

中 田 福 市・上 江 洲 典 子・前 平 房 子

琉球大学保健学部臨床病理学

宮 城 研

代用輸液の評価は、あらゆる毒性を有さず血液生理機能をより多く保有することで決まる。価値ある代用輸液の実現について多くの研究がなされて来たが、現在繁用されている製剤のうち広い血液機能を有するものはない。とくに酸素・炭酸ガス置換能を有し、栄養供給および体液、血液間の動的平衡を保持する代用輸液の開発が望まれており、実験的には Fluorocarbon¹⁾ や hemoglobin (Hb) について研究されている。

Hb 代謝に関しては現在多くの問題が残されているが、角尾ら²⁾によれば Hb は血清タンパク d₂-グロブリン分画に属するハプトグロビンと複合体を形成した後代謝される。その代謝速度は比較的速く、輸注した Hb は血流からすみやかに消失する。

in vitro では、ハプトグロビンと結合した Hb のヘムは分解されやすくなっているが、ハプトグロビンに結合しているグロビン部分はタンパク分解酵素による分解が抑制される。

他方 in vitro の実験で、native globin にフェリプロトポルフィリンを加えるとメトヘモグロビンを形成し、還元によって Hb となって酸素吸収を示すことはすでに明らかにされている。

これらのことから、輸注された native globin によって生体内で直接 Hb 生合成がおこなわれるか否かは興味深い。一方 native globin はいずれは分解されるとしても、ハプトグロビンと結合して安定化されることによって、比較的長い血中滞留が期待される。

このような考え方によってグロビン輸液の実験をおこなうのであるが、本稿においては、globin が輸液として免疫学的毒性を有するか否か、膠質滲透圧の維持能と血中アミノ酸の動態について、アミノ酸輸液との比較実験をおこなったので報告する。

実 験 方 法

1) グロビンの精製

家兎およびヒト赤血球をそれぞれ表 1 に示した如く基本的には Jope E. M. に従った変法によって家兎グロビンおよびヒトグロビンを得た。

これらの native globin 分画を凍結乾燥して保存し、用に臨み溶解して用いた。

2) 免疫学的実験

家兎赤血球から精製したグロビンを生理食塩水に溶解し、ミリポアフィルター(無菌濾過用 450m μ)を通して無菌濾過し抗原液を得た。

抗原液 0.5 ml に等量の adjuvant を加え乳化し、生後 1ヶ月の家兎臀筋内にグロビン 20 mg を注射した。初回免疫の 10日および 20日後におのおの追加免疫し、40日後に全採血して抗家兎グロビン家兎血清を分離し、56°C、20分間加温し非動化して抗体液とした。

抗原抗体反応は家兎グロビンを抗原とし、抗体稀釈法による沈降反応をおこなった。一方タンニン酸処理したヒト O 型赤血球に、家兎グロビンを感作し、抗グロビン家兎血清との間で間接血球凝集反応をおこなった。

ヒトグロビンを抗原とし、家兎に免疫して得た抗ヒトグロビン家兎血清についても家兎グロビンを抗原とした場合と同様沈降反応および間接血球凝集反応をおこなった。

3) イヌプラスマとグロビン交換

12.5kg の正常犬をラボナル溶液 (0.25g/10ml) 静注によって麻酔し、股静脈から約 100 ml 採血した。この際あらかじめ A. C. D. 溶液を加えて凝固を防ぐ。直ちに遠心して血漿を除去し、2倍量の滅菌生理食塩水 (A. C. D. 加) で血球を洗浄し、遠心分離によ

て洗浄液をすてる。ついでこの血球部分にあらかじめ滅菌済としたグロビン溶液（蛋白濃度6%）を加えて採血量と等量にして混和し、股静脈から注入した。以上の操作はすべて外科的に無菌の状態でおこなった。これによって全プラズマの $\frac{1}{6}$ が亡失し、亡失プラズマにvariグロビンが存在する状態が作りだされたことになる。

操作前および操作後適当な時間間隔をおいて5mlずつ採血し、血清総タンパク量、血清滲透圧およびアミノ酸の測定に供した。

4) イヌプラズマとアミノ酸混液交換

上述のグロビン溶液の代りにアミノ酸混液、パンアミンS（大塚製薬より提供された）を用いて全く同様

の操作を実施した。これによって全血清プラズマの $\frac{1}{6}$ が主としてアミノ酸混液と置換された状態を作り出し、その後の膠質滲透圧、遊離アミノ酸量および血清総タンパク量の変化を同様に観察した。

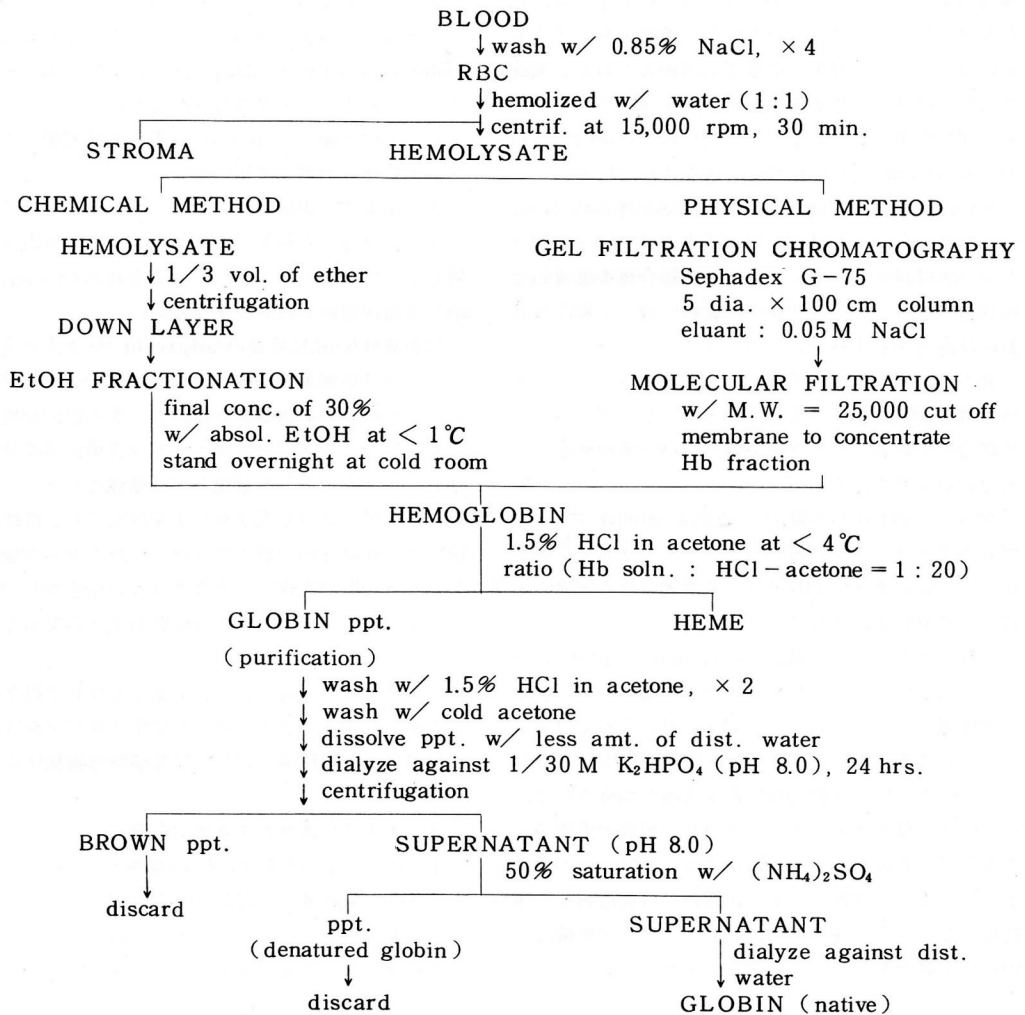
5) 血清滲透圧の測定

血清の滲透圧はAdvance digimatic osmometer, Model 3-Dを用い、氷点降下法³⁾によって測定した。検体血清は1mlを用い、それぞれの変動を追究した。

6) 血中遊離アミノ酸の定量

血清1mlに1%ピクリン酸を加えて除タンパクし、過剰のピクリン酸はDowex-1 \times 8イオン交換樹脂で除き、凍結乾燥後蒸留水に溶解し5mlとし、JLC-6AHアミノ酸自動分析機により分析定量した。

Table 1. PREPARATION OF GLOBIN



実験結果および考察

タンパク質栄養を目的とする輸液のうち、臨床的にしばしば用いられている低分子のアミノ酸混液剤については免疫学的毒性は問題とされていないが、高分子タンパク質を輸液として用いる場合最も重要な点は抗原性の有無である。

同種赤血球から得たグロビンは免疫学的に無毒とされる。しかし Hb よりヘムを分離し、グロビンを精製する過程で低温ながら 1.5% HCl-acetone に曝されるので、あるいは抗原性を獲得する可能性が考えられる。この疑問については 2) の免疫学的実験ではほぼ否定された。すなわち家兎グロビンを抗原として家兎に免疫し、抗家兎グロビン家兎血清と家兎グロビンとを重層法により抗原抗体反応を検した結果、沈降輪の形成をみなかった。沈降反応は感度が低いとされているので、同一抗原についてより鋭敏な間接赤血球凝集反応をおこなった結果もまた陰性であった。

ヒトグロビンを抗原とし、抗ヒトグロビン家兎血清と抗原抗体反応を検すると、あきらかに沈降反応および間接赤血球凝集反応いずれも強陽性であった。

家兎を用いた免疫反応に関するかぎり、同種グロビンの抗原性は否定しうるものと思う。

また異種 Hb より同様に分離したグロビンは抗原性をもつが同種グロビンは抗原性を有しないことより異種グロビンは輸液応用は不可である。かつ同種グロビンは変性しておらず免疫学的に native globin であることを示す。

一方アセトンより強力なタンパク質変性剤であるアルコールを用いて精製⁴⁾したヒト血清ガンマグロブリンやアルブミンなどが免疫学的に無害な輸液として臨床上也いわれている。

このことは精製過程において有機溶媒を用いたとしても低温で操作することにより、免疫学的に変性をもたらすものでないことを示す。グロビンの精製にあたり、タンパク質変性剤としてアルコールより弱いアセトンで、低温処理をする故に免疫学的反応にあらわれるような変性をきたす恐れは少ないであろう。

このことは免疫学的に陰性であった結果を支持している。

タンパク質水解物より得たアミノ酸輸液は組成が任意であることおよびアンモニア性窒素含有量が高く、L型結晶アミノ酸混液は塩素含有量が高いなど問題点を残している。しかし非経口的タンパク質栄養を目的とする場合はアミノ酸輸液は安全であり、広く利用され

ている。血漿タンパク質の体外亡失および慢性炎症時のアルブミン減少などで膠質浸透圧を維持し、かつタンパク質栄養を急速に要求する臨床例には加熱人血清が最適である。血液膠質浸透圧の大部分はアルブミンに由来するものであるが、グロビンの分子量(62,000)はアルブミンの分子量(69,000)よりやや小さい故、膠質浸透圧効果は大である。

犬を用い、イヌプラスマとグロビンを交換する前および後 5, 30, 90, 150分, 2日, 3日および5日の間隔でそれぞれ 5ml 採血し、膠質浸透圧ならびに血中遊離アミノ酸の変動を観察した。図 1 に示した如く、アミノ酸輸注の場合においては 30~90分後から浸透圧はやや下降する。一方グロビン輸注後 30~90分からやや上昇した。この両者の差はアミノ酸は短時間で血管外に漏出するが、グロビンはアミノ酸に比し、長時間血管内にとどまり、浸透圧を維持することを示す。

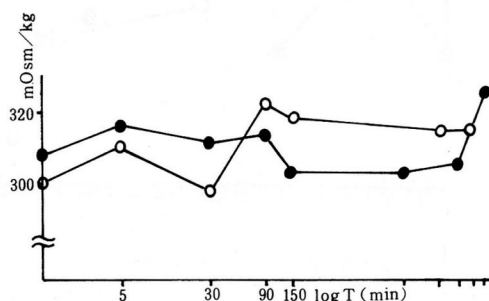


Figure 1. Effects of globin and amino acid transfusion solutions on dog serum osmolarity.

○—○ globin, ●—● amino acids

グロビンおよびアミノ酸混液輸注前後の血中遊離アミノ酸量を測定した結果を図 2 に示した。個々のアミノ酸の消長に差異はあるが、おおよそ 5 分後から増加し、30~90分で輸注前値に戻る。

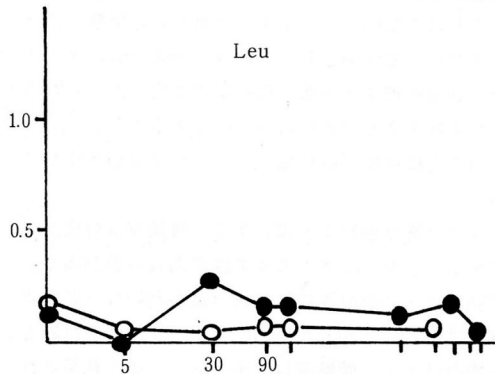
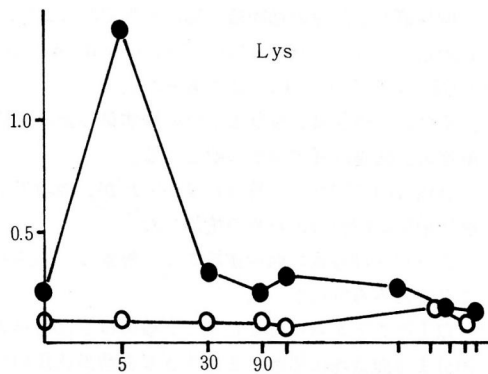
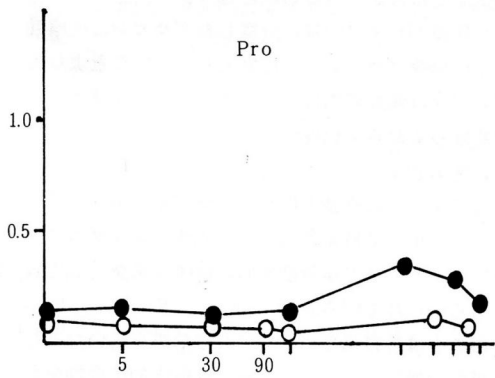
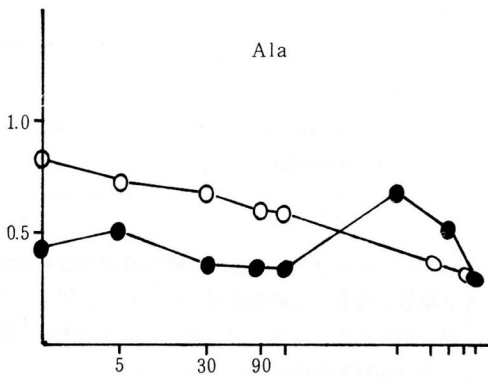
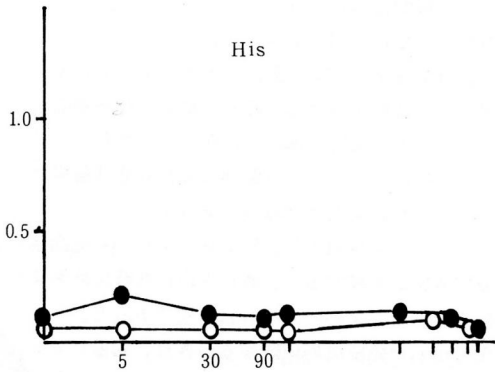
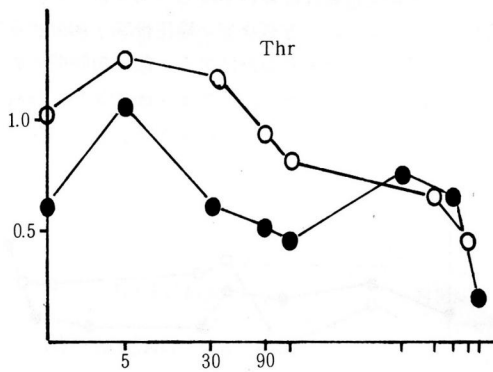
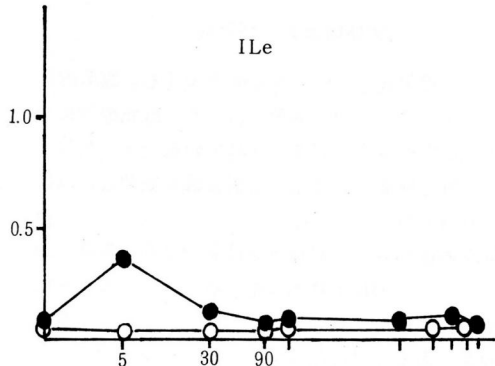
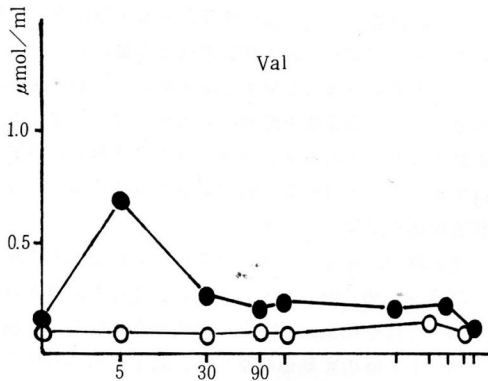
投与量と 5 分後の増加量の比はそれぞれ Val 0.23, Lys 0.17, Ile 0.16, Met 0.15, Gly 0.14, His 0.08, Phe 0.06, Leu 0 であった。

すなわち投与量と投与後 5 分の増加量の比の逆数の順位は、血管外漏出速度の順となる。

Ala および Pro は投与しなかったが、他のアミノ酸注射後 24 時間目よりやや増加した。

グロビン投与後の血中遊離アミノ酸量は、輸注前後で差異はみられなかった。

以上のことから投与したアミノ酸のほとんどが 30~90 分まで血管内に滞留するにすぎず血清浸透圧の径時



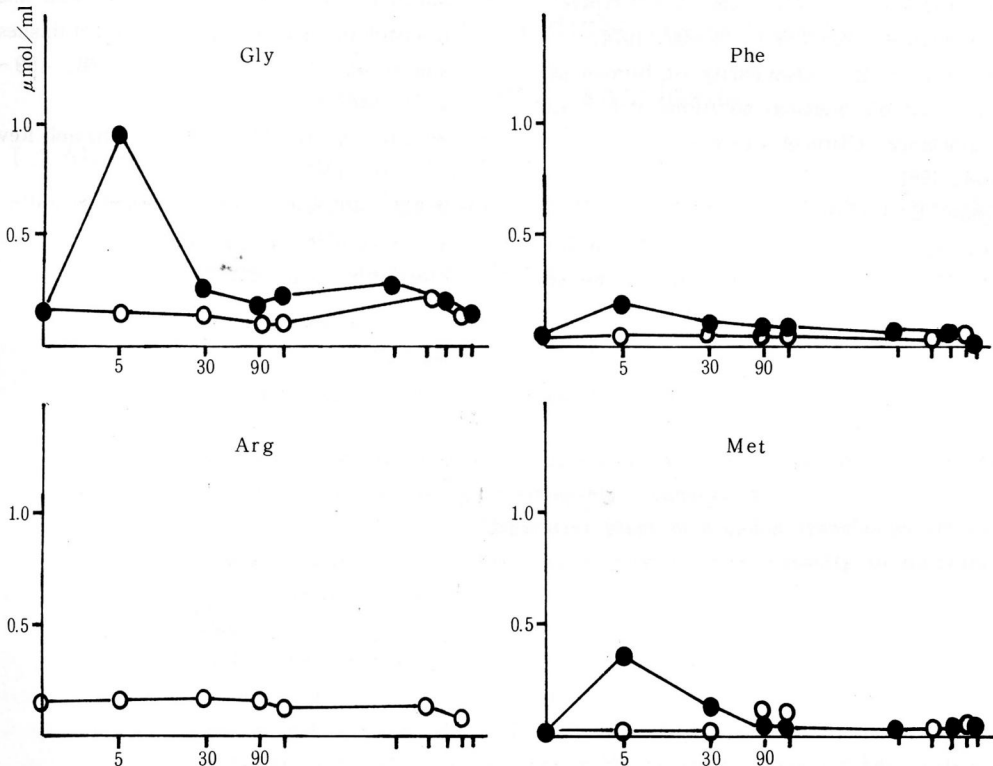


Figure 2. The patterns of dog serum amino acids concentrations following globin and amino acids transfusions.
○—○ globin, ●—● amino acids

の変動と一致する。

Plasmapheresis 実験において、12.5kg 成犬から 100ml のプラズマをとり、グロビンまたはアミノ酸と交換したことは、全プラズマの 1/10 に相当し、東ら⁵⁾ の Plasmapheresis 実験における交換量 1/5 に比し少なかった。さらに多量のプラズマ交換をおこなうことによりより明瞭に滲透圧効果がみられるであろう。

Plasmapheresis 前後の血清タンパク質量変化を測定した結果、交換直後に低下するが、2 日目では交換前より高い値を示しその後漸増した。この結果は、東ら⁶⁾ の結果と一致する。

ま と め

以上の結果から native globin は免疫学的に無毒と思われ、アミノ酸輸液と比較すると、タンパク質栄養としては同等であろうが、滲透圧維持の観点からグロビン輸液の方が優れていると思われる。栄養価および利用率に関連して、副作用のおこらない、単位時間

内に与える量の問題など検討すべきことからは多く残されているが、代用輸液として利用しうる可能性はあるものと思う。

今後は native globin を投与した場合、ヘモグロビン生成にどのように関与するかを研究し、グロビン輸液の生理機能を明らかにしたい。

この研究をおこなうにあたり、必須アミノ酸研究委員会、島菌順雄委員長の御声援と御討論に感謝し、免疫反応について御指導下さった微生物学・今村禎祐教授に感謝いたします。

輸液用パンアミン S を御提供いただいた、大塚製薬株式会社、研究開発部長、川島裕造氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Gollan, F. Clark, L. C. Jr. : Organ perfusion with fluorocarbon fluid. *Physiologist* 9, 191~199, 1966.
- 2) 角尾肇, 赤岩重雄, 比嘉弓, 進藤真知子, 高見正

- 雄, 中島熙: ヘモグロビン代謝, 東京医科歯科大学・難治疾患研究所年報 2, 35~39, 1974.
- 3) Hendry, E. B. : Osmolarity of human serum and of chemical solutions of biologic importance. *Clinical Chemistry* 7, 156 ~ 164, 1961.
 - 4) Chon, E. J., Strong, L. E., Hughes, W. L. Jr., Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Melin, M., Taylor, H. L. : A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 68, 459 ~ 475, 1946.
 - 5) Whipple, G. H., Madden, S. : *Physiol. Rev.*, 20, 194 (1940)
 - 6) 東恵彦, 中田福市: Albumin および globulin-pheresis に伴う血清蛋白質の変動について, *生物物理化学* 5, 41 ~ 46, 1958.

Studies on the Medical Application for Isoglobin Transfusion

I. Alteration of osmolarity, serum amino acids level, and immunological aspects after globin transfusion

FUKUICHI NAKADA, NORIKO UEZU, FUSAKO MAEHIRA, KEN MIYAGI*

Department of Biochemistry,

Department of Clinical Pathology,*

College of Health Sciences, University of the Ryukyus

The purpose of this study is development of an infusion solution which is capable of exchanging blood gas, supplying protein nutrients, and maintaining blood osmolarity.

In this paper we report the results of a comparative study of a globin transfusion solution and an amino acid transfusion solution in regard to immunological toxicity, capacity to maintain blood osmolarity, and movements of free amino acid in the blood.

- 1) Preparation of globin: The modified Jope method was employed.
- 2) Immunological studies: Anti globin sera of the rabbit and the human were prepared by injecting rabbit globin and human globin as antigens into different rabbits. A flocculation test by dilution method of antibody and an indirect red blood cell agglutination test were carried out by using the rabbit globin and the human globin as antigens. The rabbit isoglobin gave neither positive flocculation precipitate nor corpuscle agglutination, but the human heteroglobin clearly showed antigen-antibody reaction.
- 3) The effects of globin and amino acid transfusion solutions on serum osmolarity: A mature canine with the body weight of 12.5 kg. was anesthetized with ravalon, and plasmapheresis was carried out by injecting the globin solution with erythrocytes of a volume equivalent to the replaced plasma. Before plasmapheresis, and at intervals of 5, 30, 90, 150 minutes, 2 days, and 3 days after plasmapheresis, 5 ml. of blood sample was collected and the movements of serum osmolarity and the level of amino acids in the blood was examined. The results showed that serum osmolarity was slightly elevated by the globin solution whereas it was somewhat decreased by the amino acid solution.
- 4) Changes in the level of amino acids after transfusions of amino acid and globin solutions: Although differences in the movements of individual amino acids were observed after the transfusion of the amino acid, the level of amino acids in the blood was increased 5 minutes later, and 30 minutes later it began to return to the same concentration as before the transfusion. On the other hand, before and after the globin transfusion, the changes in amino acid concentration in the blood were not observed, but the globin transfusion tended slightly to increase the amino acid level in the blood from 2 to 5 days later.