

血液保存における中枢神経影響物質の変化に関する研究

第 2 編

— グアニジノ化合物の動態 —

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (主任: 森 昭胤教授)

石 居 昭 夫

(昭和61年7月23日受稿)

Key words : guanidino compounds
methylguanidine
arginine
blood preservation
red blood cells

緒 言

血液を保存すると種々の生化学的变化を生じるが、その中にはカリウム^{1,2)}、アンモニア¹⁻³⁾、ヒスタミン⁴⁾など輸血用血液製剤にとって望ましくない物質が蓄積する場合がある。特にアンモニアは中枢神経系への影響という面からも注意を要する物質の一つである。著者は前報において、血小板製剤が室温で保存されるため、アンモニアの蓄積が特に大きいことを示すとともに、その発生源は一部アミノ酸代謝と関連することを示した⁵⁾。

ところで、最近尿毒症の発症に関係する物質、いわゆる uremic toxin としてグアニジノ化合物が注目されている⁶⁾。グアニジノ化合物の中には、アンモニアと同様に中枢神経系に毒性を示すものがあると言われており⁷⁻¹⁰⁾、またこれらの物質の代謝は尿素サイクルなどアンモニアの代謝と関連することも示唆されている¹¹⁾。しかし、血液製剤の保存中におけるグアニジノ化合物の動態についてはこれまで全く知られていない。そこで、著者は血液製剤の品質管理の観点から、濃厚赤血球や濃厚血小板などの血液製剤の保存条件においてグアニジノ化合物が蓄積するかどうかについて調べた。さらに、グアニジ

ノ化合物の動態が血液製剤の保存状態に及ぼす影響について検討した。

方 法

1. 血液製剤の調製

血液製剤の調製は日赤業務標準¹²⁾の方法に従って行った。最初に、28 ml の citrate-phosphate-dextrose (CPD) 液を含むプラスチック製トリプルバッグ (テルモ社, BB-TC 207 J) を用い、健康者より 200 ml 採血する。これを 2,000 rpm (1,149×g) 5 分間遠心し、上層の血小板に富んだ血漿 (PRP) 約 100 ml を第 1 子バッグに移した後、親バッグを切り離す。親バッグ中には、Ht 65~70% の濃厚赤血球が残る。次に、第 1 子バッグの PRP を 3,500 rpm (3,519×g) で 5 分間遠心し、血小板をペレット状に沈降させる。血漿約 20 ml 残し、上清の血漿を第 2 子バッグに移した後、切り離して液状血漿を得る。第 1 子バッグの血小板ペレットを 22 ± 2 °C で 1 時間静置した後、穏やかな攪拌によって血漿中に再浮遊させ、濃厚血小板を得る。

濃厚赤血球と液状血漿は 5 ± 1 °C で静置保存し、濃厚血小板は 22 ± 2 °C で水平振盪 (50 cpm) を加えて保存した。

2. グアニジノ化合物の測定

表1. 濃厚赤血球の5℃保存におけるグアニジノ化合物の血漿濃度($\mu\text{mol/l}$)

Guanidino Compound	Storage Time (Days)			
	0	7	14	21
G	ND	ND	ND	ND
MG	ND	ND	ND	ND
GSA	ND	ND	0.8 ± 0.3	1.1 ± 0.4
GAA	1.9 ± 0.5	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2
CRN	52 ± 8	55 ± 6	56 ± 7	58 ± 7
Arg	87 ± 22	19 ± 5	11 ± 3	9 ± 3

n=5. ND=Not detected.

表2. 濃厚赤血球の5℃保存におけるグアニジノ化合物の赤血球内濃度($\mu\text{mol/l}$)

Guanidino Compound	Storage Time (Days)	
	0	21
G	ND	Trace
MG	ND	ND
GSA	ND	ND
GAA	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.2
CRN	49.5 ± 9.3	49.7 ± 5.8
Arg	12.2 ± 7.6	4.5 ± 0.5

n=5. ND=Not detected.

グアニジノ化合物の測定は山本等の方法¹³⁾に準拠した phenanthrenequinone 蛍光検出器を組み込んだ高速液体クロマトグラフィー(日本分光製 G-520 型グアニジノ化合物自動分析装置)¹⁴⁾を用いて行った。分離カラムは μ -Guanidinopak (日本分光製, 6 mm I.D.×35 mm L.)を使用した。

測定用検体として, 保存中の各血液製剤から適時 3~5 ml サンプリングし, 遠心によって細胞成分を完全に除去した後, 35%トリクロロ酢酸(TCA)で除蛋白した上清を用いた。また, 赤血球中のグアニジノ化合物の測定においては, 濃厚赤血球 5 ml から遠心によって血漿を除去し, さらに生理食塩液で1回洗滌し, 凍結融解を3

回繰り返した後, 35% TCA で除蛋白した上清を検体として用いた。

3. 赤血球の *in vitro* 検査

赤血球の ATP 値及び 2,3-DPG 値は, それぞれ ATP キット(BMY 社, No.123897)及び 2,3-DPG キット(Sigma 社, No.35-UV)を用いて測定した。アンモニアの測定は微量拡散法¹⁵⁾を応用したアミテストメーター(中外製薬)を用いて行った。遊離ヘモグロビン濃度は tetramethylbenzidine 法¹⁶⁾で測定し, 溶血率(%)に換算した。Morphology score は Uda 等¹⁷⁾の方法に従い, 赤血球の形態を discocyte, echinocyte-I, echinocyte-II, spherocyte の 4 群に分け, それぞれの存在率(%)に 3, 2, 1, 0 点を与えて score を算出した。

結 果

表1に, 濃厚赤血球を $5 \pm 1^\circ\text{C}$ で保存した時のグアニジノ化合物の血漿濃度を示す。グアニジン(G)及びメチルグアニジン(MG)は21日間の保存中全く検出されなかった。グアニジノコハク酸(GSA)は, 保存当初においては検出されなかったが, 14日後から若干検出された。グアニジノ酢酸(GAA)は低濃度であるが, 保存中ほぼ一定量検出された。クレアチニン(CRN)とアルギニン(Arg)は比較的高濃度に検出されたが, CRN が保存中ほぼ一定濃度を示すのに対し, Arg は保存により急激に減少した。

表2に, 濃厚赤血球を同条件で21日間保存し

表3. 濃厚血小板の22°C保存におけるグアニジノ化合物の血漿濃度($\mu\text{mol/l}$)

Guanidino Compound	Storage Time (Days)			
	0	1	2	3
G	ND	ND	ND	ND
MG	ND	ND	ND	ND
GSA	ND	ND	ND	ND
GAA	4.1 \pm 2.7	3.9 \pm 1.9	3.4 \pm 1.5	3.8 \pm 2.1
CRN	74.5 \pm 16.0	80.1 \pm 2.0	72.4 \pm 0.6	84.4 \pm 9.3
Arg	80.7 \pm 13.0	89.7 \pm 24.0	86.0 \pm 17.0	102.0 \pm 15.0

n=3. ND=Not detected.

表4. 液状血漿の5°C保存におけるグアニジノ化合物の濃度($\mu\text{mol/l}$)

Guanidino Compound	Storage Time (Days)			
	0	7	14	21
G	ND	ND	ND	ND
MG	ND	ND	ND	ND
GSA	ND	ND	ND	ND
GAA	4.5 \pm 1.4	4.4 \pm 2.1	4.4 \pm 1.8	4.4 \pm 1.7
CRN	73.2 \pm 9.7	68.5 \pm 15.0	67.7 \pm 11.0	67.9 \pm 9.4
Arg	88.2 \pm 3.0	87.3 \pm 17.0	94.5 \pm 7.4	106.0 \pm 13.0

n=3. ND=Not detected.

た時のグアニジノ化合物の赤血球中の濃度を示す。G, MG, GSA はほとんど検出されず、またGAA, CRN濃度も大きな変化はなかったが、Argは著明に減少した。

表3に、濃厚血小板を22 \pm 2°C(常法)で保存した時のグアニジノ化合物の血漿濃度を示す。いずれの化合物も3日間の保存中ほぼ一定の濃度を示し、大きな変化は認められなかった。

表4に、液状血漿を5 \pm 1°Cで保存した時のグアニジノ化合物の濃度を示す。Argが経日的に若干上昇したが、他のグアニジノ化合物は21日間の保存中ほとんど変化がなかった。

濃厚赤血球の保存において特に顕著な変化を示したArgの影響を検討するため、Argの分解産物であるオルニチン(Orn)及び尿素の濃度

を測定した(表5)。さらに、赤血球の保存状態の判定のための代表的指標である adenosine triphosphate(ATP)レベル、2,3-diphosphoglycerate(2,3-DPG)レベル、及び morphology scoreを同時に測定した(表5)。その結果、Argの減少度とOrn及び尿素の上昇度にほぼ逆相関傾向が認められた。また、この傾向はArgを外部から添加した場合にもみられた(表6)。ATP、2,3-DPG及び morphology scoreはいずれも経日的に減少し、特に2,3-DPGが顕著であった(表5)。

濃厚赤血球にArgを1mmol/l(終濃度)添加した時のアンモニア値(図1)、2,3-DPGレベル(図2)、ATPレベル(図3)、morphology score(図4)及び溶血率(図5)を示す。Arg

表5. 濃厚赤血球の5°C保存におけるArg及びその関連物質の濃度変化

Guanidino Compound	Storage Time (Days)			
	0	7	14	21
Arg ($\mu\text{mol/l}$)	86.8	18.8	10.7	9.3
Orn ($\mu\text{mol/l}$)	150	245	247	310
Urea ($\mu\text{mol/l}$)	3500	3700	3800	4000
ATP ($\mu\text{mol/gHb}$)	3.9	3.6	3.1	2.5
2,3-DPG ($\mu\text{mol/gHb}$)	13.0	12.0	4.8	1.3
Morphology score*	300	290	280	250

n=5. *Maximum: 300.

表6. Arg*を添加した濃厚赤血球の5°C保存におけるArg, Orn及びUreaの濃度変化($\mu\text{mol/l}$)

	Storage Time (Days)			
	0	7	14	21
Arg	1080	260	120	100
Orn	190	850	1010	NT
Urea	4400	NT	5000	5000

n=5. NT=Not tested.

*Argの終濃度: 1 mmol/l.

の添加によりアンモニア値が若干高くなる傾向が認められたが(7日以降の2群の差は有意: $p < 0.05$), ATPレベルはほとんど影響を受けなかった。2, 3-DPGレベルでは, 個体差が大きく統計学的有意差はなかったが, 平均値を比べるとArg添加群が非添加群より若干高くなる傾向を示した。保存28日以後において, Arg添加群が非添加群より morphology scoreでは有意に高値を示し($p < 0.05$), 溶血率では有意に低値を示した($p < 0.05$).

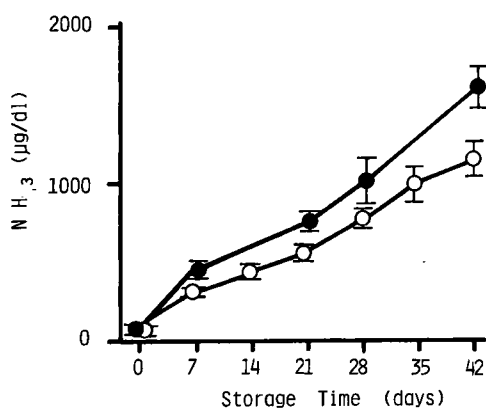


図1. 濃厚赤血球の5°C保存におけるアンモニア値に及ぼすArgの影響(Mean±SD).

○: control

●: Arg添加群(終濃度: 1 mmol/l)

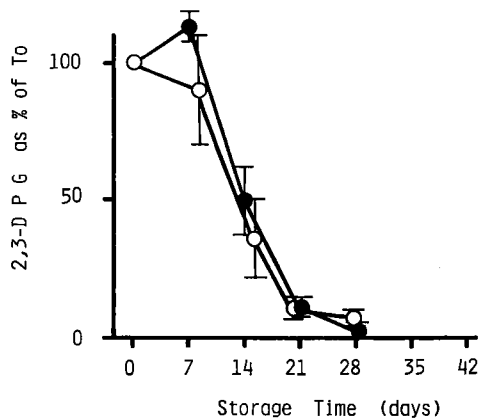


図2. 濃厚赤血球の5°C保存における2,3-DPGレベルに及ぼすArgの影響(Mean±SD)

○: control

●: Arg添加群(終濃度: 1 mmol/l)

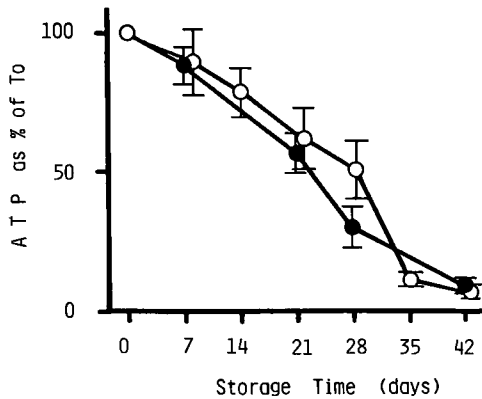


図3. 濃厚赤血球の5°C保存におけるATPレベルに及ぼすArgの影響 (Mean±SD).

○: control
●: Arg添加群(終濃度: 1 mmol/l)

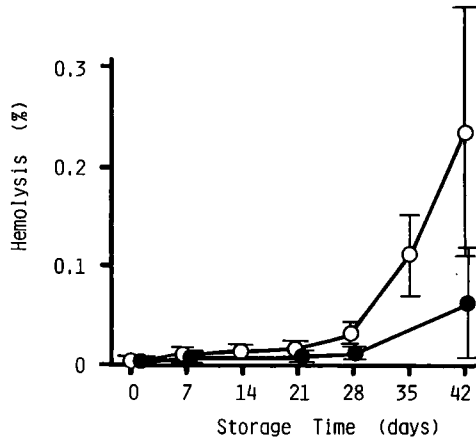


図5. 濃厚赤血球の5°C保存における溶血率に及ぼすArgの影響 (Mean±SD).

○: control
●: Arg添加群(終濃度: 1 mmol/l)

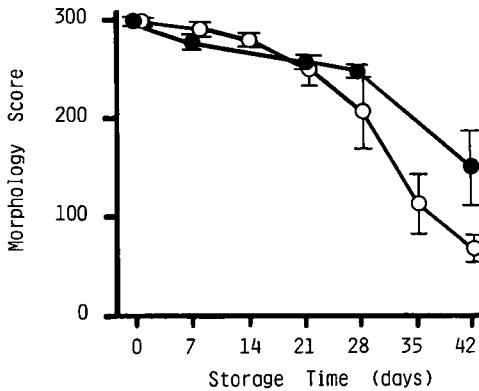


図4. 濃厚赤血球の5°C保存における赤血球のmorphology scoreに及ぼすArgの影響 (Mean±SD).

○: control
●: Arg添加群(終濃度: 1 mmol/l)

考 察

哺乳動物の生体内にはG, MG, GSA, GAA, CRN, Argなどのグアニジノ化合物が存在することが知られている。それらはいずれの化合物も分子中にNH₂-C(=NH)-NH-基を有するので強い塩基性を示し、分解すると尿素とアンモニア、またはアミノ化合物になる。そのうち、G, MG, GSA, GAAなどのグアニジノ化合物は通常尿毒症など腎不全時の血中に増量する物質であるが、アンモニアが血液製剤の保存中に蓄

積することを考慮すると、血液製剤のグアニジノ化合物の動態について把握しておくことは品質管理の面から重要であろう。

本研究では、主な血液製剤である濃厚赤血球、濃厚血小板及び液状血漿のそれぞれの保存条件においてグアニジノ化合物の濃度を測定した。その結果、いずれの製剤においてもグアニジノ化合物の大きな変動はみられないことがわかった。Uremic toxinとして特に毒性の強いものはMGとGSAであるが、MGは血液製剤の保存中全く検出されないか、または痕跡程度検出されるに過ぎなかった。腎不全患者では、MGの濃度は血漿中より肝臓や筋肉などの細胞内濃度が高いことが報告されているので¹⁸⁾、著者も赤血球内の濃度を測定したが、この場合もMGは検出されなかった。

一方、GSAは濃厚赤血球の保存において2週間後から0.8~1.1μmol/l検出されたが、他の研究における健康人の血漿濃度(1.1±0.2μmol/l)¹⁹⁾とほぼ同等の値であり、慢性血液透析患者の濃度(14.9±5.9μmol/l)¹⁹⁾に比べると極めて低いレベルに留っていた。その他、GAA, クレアチニンなどは保存初期からMGやGSAより高濃度に検出されたが、保存によって増加する傾向は認められなかった。以上のことから、グアニジノ化合物はアンモニアのように血液製

剤の保存によって蓄積する傾向は示さないで、血液製剤の使用時においてグアニジノ化合物による輸血副作用を危惧する必要はないと考えられる。

今回の研究では、血液の保存によって顕著に増加するグアニジノ化合物は認められなかったが、反対に濃度が著明に減少したグアニジノ化合物に Arg がある。特に濃厚赤血球の保存において、Arg は1週間後ですでに初期値の約20%まで低下した。この Arg の減少傾向は濃厚血小板や液状血漿の保存においてはみられなかったため、赤血球の代謝と関係すると思われる。生体内では、腎不全時において Arg が MG、GSA の前駆体となることが推測されている²⁰⁾。しかし、血液の保存においては MG や GSA の増加は認められなかったため、このような反応は起こっていないと考えられる。赤血球には肝臓ほど高くはないが arginase 活性が存在すること^{21, 22)}、また今回の実験から Arg の減少に伴って Orn と尿素が増加したことなどから、Arg の減少は恐らく arginase による分解反応に基づくことと推定される。ここで生成する尿素は溶液中では一部シアン酸とアンモニアに自然分解され得るので²³⁾、これがアンモニアの発生源となる可能性がある。実際に、Arg を濃厚赤血球に加えて保存すると、アンモニア濃度が若干高くなる現象が認められた (図1)。

Arg の減少が及ぼす影響として考慮すべきも一つの問題は、赤血球の機能への影響である。生体内では赤血球は通常一定量の Arg を含む血漿中に浮遊されていると思われるが、保存においては1週間後から Arg 濃度の希薄な血漿にさらされることになる。ところで、赤血球の最も重要な機能の一つである酸素運搬能は2,3-DPG によって第一義的にコントロールされている。この物質は pH の低下に特に敏感であるので、塩基性物質である Arg の減少によって影響を受ける可能性は十分推測される。実際に、Arg を外部から添加すると、保存1~2週間後における2,3-DPG レベルが若干高値に維持されることがわかった (図2)。

これに加え、Arg を添加すると赤血球の形態の維持や溶血率の減少にも大きな効果を有することが認められた。すなわち、Arg は赤血球の酸

素運搬能に関する2,3-DPG レベルだけでなく、赤血球の viability の指標である morphology score や溶血率の改善にも有効であることが示された。赤血球の保存法における現在の基本的な考え方は、adenine を加えて赤血球の ATP 合成系を活性化し、その結果赤血球の viability を延長できるようにすることである²⁴⁾。しかし、この方法の問題点は adenine が2,3-DPG レベルの維持に対しては効果がなく、むしろ悪影響を及ぼすことである。これまでに、この両者を同時に改善する物質として phosphoenolpyruvate (PEP) が報告されている²⁵⁾が、PEP は37°C で incubate しないと効果を示さないこと、熱に不安定であること、高価であることなど、実用的な問題が多い。このような観点から、Arg は新しい血液保存剤としての有用性が示唆される。

Arg を血液保存剤として使用する際の問題点の一つは、先に指摘したようにアンモニアが若干増加することである。また、Arg の作用機構についてもまだ不明な点が多い。従って、Arg を血液保存剤として実用化するためには、今後これらの点の解明が重要な課題となろう。

結 語

血液製剤の品質管理を目的とし、濃厚赤血球や濃厚血小板の保存におけるグアニジノ化合物の動態について検討し、以下の結果を得た。

1) いずれの血液製剤の保存においても、毒性の強い MG、GSA などの増加はほとんど認められなかったため、この種の化合物による輸血副作用の問題はないと考えられる。

2) 濃厚赤血球の保存中に Arg が著明に減少した。この時、Arg を外部から添加すると、赤血球の2,3-DPG レベル及び形態が良好に維持され、溶血率も減少したので、Arg を血液保存液の一分成分として使用することの有用性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った岡山大学森 昭胤教授に深甚の謝辞を表します。種々有益な御助言ならびに御討論頂いた岡山県赤十字血液センター宇多正行博士に深謝致します。また、本研究の実験に協力して頂い

た岡山県赤十字血液センター山村一修士に心から感謝 致します。

文 献

1. Bailey, D.N. and Bove, J.R.: Chemical and hematological changes in stored CPD blood. *Transfusion* 15, 244-249, 1975.
2. Latham Jr., J.T., Bove, J.R. and Weirich, F.L.: Chemical and hematological changes in stored CPDA-1 blood. *Transfusion* 22, 158-159, 1982.
3. Ukrainski, C.T., Goldfinger, D., Pomerance, J.J., Lee, H.C., Farber, S. and Sanchez, R.: Ammonia accumulation in platelet concentrates during storage. *Transfusion* 21, 113-117, 1981.
4. Frewin, D.B., Jonsson, J.R., Head, R.J., Russell, W.J. and Beal, R.W.: Histamine levels in stored human blood. *Transfusion* 24, 502-504, 1984.
5. 石居昭夫: 血液保存における中枢神経影響物質の変化に関する研究 (第1編) — 血小板濃縮液の保存中におけるアンモニアの蓄積 —. 岡山医学会雑誌, 97, 815-822, 1985.
6. 中尾俊之, 宮原 正: 腎不全 — Uremic toxin —. 臨床検査, 27, 753-761, 1983.
7. Edwards, C. and Kuffler, S.W.: The blocking effect of γ -aminobutyric acid (GABA) and the action of related compounds on single nerve cells. *J. Neurochem.* 4, 19-30, 1959.
8. Purpura, D.P., Girado, M., Smith, T.G., Callan, D.A. and Grundfest, H.: Structure-activity determinants of pharmacological effects of amino acids and related compounds on central synapses. *J. Neurochem.* 3, 238-268, 1959.
9. 渡辺洋子, 藤本 昇, 森 昭胤: てんかん患者髄液中グアニジノ化合物の測定について. 脳研究会会誌, 8, 76-77, 1975.
10. Mori, A., Akagi, M., Katayama, Y. and Watanabe, Y.: α -Guanidinoglutaric acid in cobalt-induced epileptogenic cerebral cortex of cats. *J. Neurochem.* 35, 603-605, 1980.
11. Natelson, S. and Sherwin, J.E.: Proposed mechanism for urea nitrogen re-utilization: Relationship between urea and proposed guanidine cycles. *Clin. Chem.* 25, 1343-1344, 1979.
12. 赤十字血液センター業務標準・技術部門. 日本赤十字社血液事業部, p.106, 1985.
13. Yamamoto, Y., Saito, A., Manji, T., Nishi, H., Ito, K., Maeda, K., Ohta, K. and Kobayashi, K.: A new automated analytical method for guanidino compounds and their cerebrospinal fluid levels in uremia. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 24, 61-68, 1978.
14. Mori, A., Katayama, Y., Higashidate, S. and Kimura, S.: Fluorometrical analysis of guanidino compounds in mouse brain. *J. Neurochem.* 32, 643-644, 1979.
15. Tada, K., Tateda, H. and Metoki, K.: A new method for screening of hyperammonemia. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 153 (Urea cycle disease), ed. A. Lowenthal, A. Mori and B. Marescau, Plenum Press, New York and London, pp.19-27, 1982.
16. Levinson, S.S. and Goldman, J.: Measuring hemoglobin in plasma by reaction with tetramethylbenzidine. *Clin. Chem.* 28, 471-474, 1982.
17. Uda, M., Ohkuma, S., Ishii, A. and Nishizaki, T.: Preparation of blood components with saline-adenine-glucose-phosphate-maltose quadruple-pack system. *Transfusion* 25, 325-329, 1985.
18. Giovannetti, S., Balestri, P.L. and Barsotti, G.: Methylguanidine in uremia. *Arch. Intern. Med.* 131, 709-713, 1973.
19. 島山義典, 千葉栄市, 新居正一, 鈴木敏行: 各種透析法 (HD, HF, SGM, CWD) における血漿中, 赤血球内 Guanidino Compounds の変動. 第4回グアニジノ化合物分析研究会抄録, p.55, 1981.

20. Orita, Y., Tsubakihara, Y., Ando, A., Nakata, K., Takamitsu, Y., Fukuhara, Y. and Abe, H.: Effect of arginine or creatinine administration on the urinary excretion of methylguanidine. *Nephron* 22, 328-336, 1978.
21. Tomlinson, S. and Westall, R.G.: Arginosuccinic aciduria. Argininosuccinase and arginase in human blood cells. *Clin. Chem.* 26, 261-269, 1964.
22. 水谷直樹, 前原光夫, 早川智恵美, 加藤智昭, 渡辺一功: 高アルギニン血症に対する交換輸血療法の効果についての検討. *小児科臨床*, 38, 2619-2624, 1985.
23. Gilboe, D.D. and Javid, M.J.: Breakdown products of urea and uremic syndrome. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115, 633-637, 1964.
24. Moore, G.L.: Red blood cell preservation: A survey of recent research. In *Blood Storage and Preservation*, ed. P.R. Sohmmer and C.A. Schiffer, American Association of Blood Banks, pp.9-22, 1982.
25. Hamasaki, N. and Hirota-Chigita, C.: Acid-citrate-dextrose-phosphoenolpyruvate medium as rejuvenant for blood storage. *Transfusion* 23, 1-7, 1983.

**Changes in substances affecting the central nervous system
in stored blood products**

II. Analysis of guanidino compounds in blood products

Akio ISHII

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical school

(Director: Prof. A. Mori)

Guanidino compounds in blood products, including red cell concentrate, platelet concentrate and liquid plasma, were fluorometrically analyzed with a guanidino compound analyzer. Highly toxic guanidino compounds such as methylguanidine and guanidinosuccinic acid were not found in any blood product under usual storage conditions. The levels of guanidinoacetic acid and creatinine in these products changed little during storage. On the other hand, the concentration of arginine decreased markedly over storage time and reached approximately 20% of the initial value after 7 days of storage. Addition of arginine at a final concentration of 1 mmol/l to the red cell concentrate resulted in better maintenance of the 2,3-DPG level and morphology score of red cells. Moreover, arginine showed a protecting effect against hemolysis. These data indicate that adverse reactions due to guanidino compounds may be neglected in blood transfusion, and that arginine should be useful as a blood preservative.