

# 赤血球細胞およびゴーストによる イオン性薬物取り込みのマイクロカロリメトリー ——薬物誘発溶血のメカニズムに関連して——

山本孫兵衛, 安藝初美

(平成3年9月24日受理)

## Microcalorimetry for the Uptake of Ionic Drugs by Erythrocyte Cells and Ghosts — In Relation to a Mechanism of the Drug-induced Hemolysis —

Magobei Yamamoto and Hatsumi Aki

(Received September 24, 1991)

Ionic drugs of chlorpromazine (CPZ), promethazine (PMZ), flufenamic acid (FA) and mefenamic acid (MA) were compared with each other as regards the hemolytic action, the thermodynamics of drug binding to human erythrocyte membrane and the uptake into the cell. (1) All the drugs binding interaction with human erythrocyte was spontaneous and exothermic as indicated by negative signs of free energy and enthalpy changes, and conversely the endothermic heat effect was found to be due to hemolysis and disruption of the membrane structure. (2) Cationic drugs, CPZ and PMZ, were bound and/or inserted to the inner erythrocyte membrane with a high affinity. The reactions were characterized by small negative enthalpy and large positive entropy changes which were contributed by hydrophobic interaction between drugs and the phospholipids in the membrane. While, the human erythrocyte had two kinds of binding sites on the cell membrane for anionic drugs, FA and MA; one strong binding site and other weak site with the lower affinity which were due to both ionic and hydrophobic interactions. About 15% of the bound drugs was penetrated into the intracellular membrane. The first class of the binding site was already saturated before hemolysis and the second class might play a significant role in hemolysis by the drugs. (3) As the results, a tentative mechanism for the ionic drug-induced hemolysis is proposed.

福岡大学薬学部薬剤学教室：福岡市城南区七隈8-19-1  
〒814-01

Department of Pharmaceutics, Faculty of  
Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,  
Fukuoka University, Fukuoka 814-01, Japan

### 1. 緒言

多くの薬物、例えば、非ステロイド性抗炎症薬などの  
アニオン性薬物やフェノチアジン類抗精神病薬などのカ  
チオン性薬物は、循環血流中で、血漿たん白質と同様に  
赤血球細胞に可逆的な分布ないしは結合をし、高濃度で

は、しばしば溶血現象を誘発する<sup>14)</sup>。イオン性薬物の誘発する溶血プロセスにおいて、アニオン性薬物とカチオン性薬物とでは、溶血速度または溶血率、赤血球細胞の形状変化および細胞膜の外方突出(membrane externalization)または内方陥没(membrane internalization)の変形などに差異が見られ、溶血のメカニズムに深く関与して異なるという<sup>4,10)</sup>。

例えば、Mohandes & Feo<sup>6)</sup>は、フェノチアジン誘導体の赤血球細胞への取り込みによる細胞の形状変化の程度が、細胞に結合した薬物量に依存しているとした。またSheetz & Singer<sup>7)</sup>は、赤血球膜脂質二重層の各層への薬物取り込み量が異なるため細胞の形状変化が起こるとした。Ogiso *et al.*<sup>10)</sup>は、クロルプロマジンは赤血球膜に結合し、脂質環境をより流動化し、溶血作用の激しいほど膜内部に深く入り込んでいるとした。しかし、いずれの報告でも、薬物が赤血球細胞へどれ位取り込まれ、どれ位細胞膜へ結合し、さらにどの部位に結合して溶血が起こるかの定量的相関は不詳である。また、カチオン性薬物とアニオン性薬物によって異なる赤血球膜との相互作用と、それに続く溶血作用のメカニズムについても適切な説明はほとんど皆無に近い。

従来、薬物と血液細胞との結合の定量的研究は、平衡透析実験<sup>11,12)</sup>によるか、血漿中または緩衝液中においての結合形薬物/非結合形薬物比や、血液中と血漿中における分配濃度比からの換算によることが多い<sup>7,10)</sup>。そのため、薬物と血液や赤血球細胞の薬物結合実験では大きい誤差を伴う<sup>13,14)</sup>。そこで、薬物と赤血球細胞との間の相互作用については、血液中で結合または分布している状態で直接測定する必要がある、その測定手法としてマイクロカロリーメーターは有用である<sup>15-18)</sup>。とくに、フロー形マイクロカロリーメーターは、他の測定手法では難問題となる透析膜やゲル系過素材への非特異的吸着がほとんどなく、薬物の結合形と非結合形の分離操作を必要としない<sup>18)</sup>。光学的に不透明な濃厚溶液、またはサスペンション液の少量の生物試料でも非破壊的に測定可能である。さらに、熱量滴定カーブからは、所定温度において、結合パラメータと同時に結合の熱力学的パラメータを算出できる利点をもつ<sup>19)</sup>。本報告では、ヒト赤血球細胞膜に対するイオン性薬物の熱力学的相互作用を確かめ、薬物誘発溶血のメカニズムとの関連性を考察した。

2. 実験

2.1 試料

クロルプロマジン(CPZ)塩酸塩、プロメタジン(PMZ)塩酸塩、フルフェナム酸(FA)ナトリウム塩およびメフェナム酸(MA)ナトリウム塩はSigma (USA) 製品、

[<sup>14</sup>C]CPZ (50 mCi/nmol)はAmersham International plc (UK)製品、[<sup>14</sup>C]FA (50 mCi/nmol)はAl' Energie Atomique (France)製品を使用した。ヒト赤血球(日赤血液センター福岡提供)は、等張NaClリン酸緩衝液(PBS) (NaCl 90.99g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O 3.43g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 34.425g・l<sup>-1</sup>, pH7.4)サスペンション液とし、使用前には必ずPBSで上澄液が無色透明になるまで数回繰り返し洗浄し、100%充填赤血球細胞にした。ヘモグロビン含有の赤血球ゴースト(模標品)の調整はDodgeの方法<sup>20)</sup>、たん白質濃度の測定はLowryの方法<sup>21)</sup>、そして赤血球サスペンション液中の血球数はコールターカウンターModel TA-2 (USA)で測定した。

2.2 薬物誘発溶血

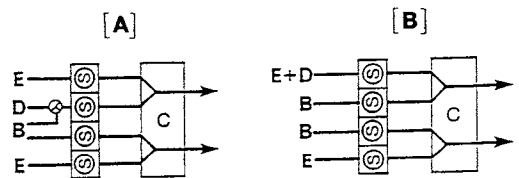
各濃度の薬物溶液9.8mlと赤血球サスペンション液2.0mlを混合し、混合液は90min, 37℃でインキュベーションし、1000×g, 10minで遠心分離した後、上澄液中のヘモグロビン量をE (1cm, 543nm)値から求めた。溶血率(%)は水完全溶血率を100%とした。

2.3 ミクロカロリーメーター

カロリーメータは差動フロー形カロリーメータ(断熱形、双子セル形)<sup>15)</sup>を用いた。送液法はGilson minipuls 2ポンプ4チャンネルTygonチューブ(France)方式である。薬物と赤血球細胞およびゴーストとの結合反応熱量は、別途に測定した薬物希釈熱量を差引く測定モード[A] (Fig. 1)で、薬物誘発溶血反応によるヘモグロビンの細胞溶出の希釈熱量はモード[B]で測定した。

2.4 赤血球細胞およびゴースト膜への薬物の取り込みの測定

赤血球細胞のPBSサスペンション液(2%ヘマトクリット)はCPZまたはFAを加えて、0.05 mMまたは0.1 mM液(最終濃度0.02 μCi・ml<sup>-1</sup>の[<sup>14</sup>C]FAまたは[<sup>14</sup>C]CPZ)に調整した。各液は25℃、または37℃でインキュベーションし、反応は2倍量の冷却生理食塩液で停止さ



☐ calorimeter, ▭ mixing vessel, ⊗ peristaltic pump, B buffer, P protein, D drug, E erythrocyte.

Fig. 1 Experimental modes of calorimetry for drug binding to blood cells and drug-induced hemolysis.

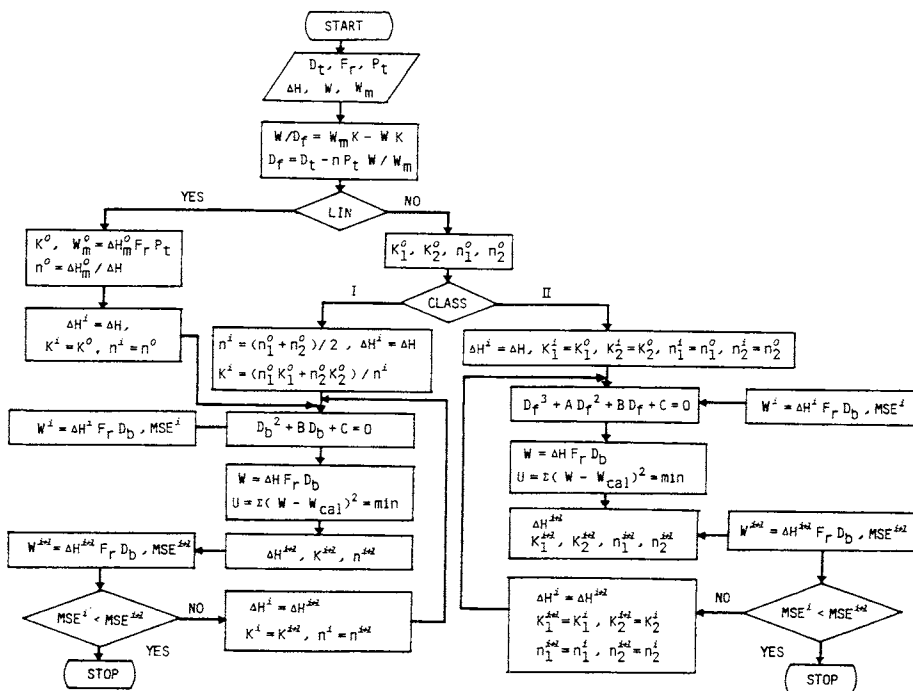


Fig. 2 Flow chart of the program for analysis of calorimetric titration curve.

せた。赤血球細胞サスペンション液は、1,000×g, 10min 10°Cで遠心分離し、冷却生理食塩液で2回繰返し洗浄した後、細胞部分0.1mlをPackard Soluene (USA) / iso-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH (1:1 v/v)混合液1.5mlで可溶化し、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5mlを加えて脱色し、混合液は25°C, 10ml, その後40°C, 20min加温した後、Packard Insta-Gel (USA) / 0.05M HCl (9:1%)混合液15mlを加え、激しく振盪混和して液体シンチレーション液を調整した。一方、遠心分離した上澄液0.1mlにAmersham ACS-II (UK) 15mlを加え、シンチレーション対照液とした。放射能活性はPackard Tri-Carb 2660液体シンチレーションカウンター(USA)でチャンネル比法で測定した。赤血球細胞への取り込み薬物量は、<sup>14</sup>C]CPZ および <sup>14</sup>C]FAのdpmから算出した。

細胞膜への薬物取り込みは、20%ゴーストサスペンション液2mlに各濃度の<sup>14</sup>C]CPZまたは<sup>14</sup>C]FAを加え、37°Cでインキュベーションした。ゴーストは等張食塩液で洗浄し、10,000×g, 30minの遠心分離を4回繰返しした後、5倍量の蒸留水で溶血させた。溶血液1mlについて、Soluene/iso-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH液で可溶化し、放射能活性を測定した。

## 2.5 結合パラメータおよび熱力学パラメータの計算

薬物と赤血球またはゴーストとの結合反応熱量(W<sub>r</sub>)

$$* M = \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}, 1 \cdot \text{dm}^{-3}$$

は一定たん白質濃度(P<sub>t</sub>)における薬物・たん白質コンプレックスの生成量に比例するから、薬物のモル結合エンタルピー(ΔH)、一定送液速度(F<sub>r</sub>)、結合薬物濃度(D<sub>b</sub>)によって、

$$W_r = \Delta H \cdot F_r \cdot D_b \quad (1)$$

である。

一般に、薬物とたん白質の結合反応は逐次反応にしたがいがい、

$$D_b = P_t \cdot \sum_{i=1}^m (n_i \cdot K_i \cdot D_f) / (1 + K_i \cdot D_f) \quad (2)$$

である。そこで、mは結合部位の種類数、n<sub>i</sub>はi種結合部位数、K<sub>i</sub>は結合定数、D<sub>f</sub>は非結合薬物濃度で次式で定める(D<sub>t</sub>は全薬物濃度)。

$$D_t = D_b + D_f \quad (3)$$

いま、結合部位が1種類(m=1)の場合式3は、

$$D_b^2 - (1/K_1 + n_1 \cdot P_t + D_t) D_b + n_1 \cdot P_t \cdot D_t = 0 \quad (4)$$

結合部位が2種類(m=2)の場合は、

$$D_f^3 + \{P_t (n_1 + n_2) + (1/K_1 + 1/K_2) - D_t\} \cdot D_f^2 + P_t (n_1 \cdot 1/K_1 + n_2 \cdot 1/K_2) - D_t (1/K_1 + 1/K_2) + 1/K_1 \cdot 1/K_2 \cdot D_f - P_t \cdot 1/K_1 \cdot 1/K_2 = 0 \quad (5)$$

結合反応熱量の実測値から、式(1)~(5)をあてはめ計算を繰返し非線形最小二乗法で行い、パラメータn, K,

$\Delta H$ の最適値を計算した。計算プログラム(Fig.2 フローチャート)はFACOM M-380Rで実行し、初期値はScatchardプロットから求めた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 薬物誘発赤血球溶血と発生熱量

薬物誘発による溶血率と発生熱量との時間変化は、4%赤血球サスペンション液と1.0mMCPZまたは2.0mMFAのそれぞれをインキュベーションした場合、Fig.3に示すように溶血反応はすべて吸熱的であり、赤血球から溶出した非結合形ヘモグロビン量に良く対応した。細胞1個当たりのエンタルピー変化( $\Delta H_{hem}$ )を完全溶血に対応するプラト- $W_r$ 値から求めると、CPZとFAの $\Delta H_{hem}$ はほぼ等しく、 $\Delta H_{hem} = 20 \pm 1.0 \text{ pJ} \cdot \text{cell}^{-1}$ であった。

カチオン性薬物は、CPZ例の如く、溶血作用は急速であり、2~3minで溶血率100%に到達したが、しかし、

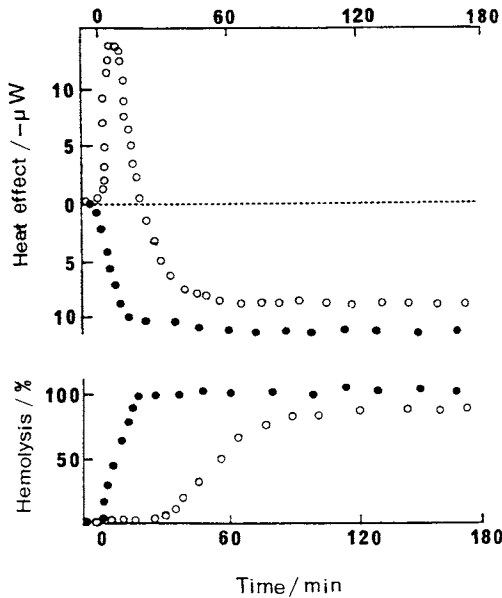


Fig. 3 Hemolytic profiles of heat effect (upper) and percent hemolysis of the calorimetric solution (bottom) at 37°C. Human erythrocytes in 4% (v/v) suspension were incubated with 1.0 mM CPZ (●), 2.0 mM FA (○). The percentage of hemolysis was expressed as the ratio the absorbance at 543 nm in the final calorimetric solution to the absorbance after the complete hemolysis in water.

アニオン性薬物は、FA例の如く、ラグタイム10~20minにおいて溶血は急増し始めた。薬物誘発溶血はすべて吸熱反応で開始して急速に進行する、しかしアニオン性薬物のラグタイムでは発熱反応が著しい、などの特徴がある。

#### 3.2 薬物と赤血球ゴースト膜との結合の熱量滴定

##### カーブ

イオン性薬物と40%赤血球ゴースト液(最終たん白質濃度 $2.112 \pm 0.253 \times 10^{-5} \text{ M}$ )の結合熱量滴定カーブでは、カチオン性薬物は3相性の変化、アニオン性薬物は単相性の変化を示した(Fig.4)。第1相はCPZ < 0.1 mM, PMZ < 0.1 mMの場合で、発熱的であり、薬物の濃度の増加にともない結合熱量は大きくなった。第2相はCPZ 0.2~0.7 mM, PMZ 0.1~0.4 mMの場合で、発熱的であり、結合熱量はプラト-値をとった。最終の第3相はCPZ > 0.7 mM, PMZ > 0.4 mMの場合で、吸熱的に転じた。それはCPZとPMZがゴースト膜との結合反応のみならず、膜のコンフォメーション変化、もしくは膜構

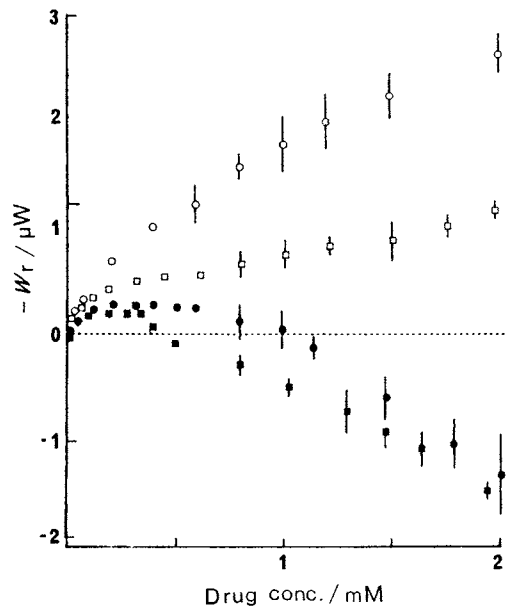


Fig. 4 Calorimetric titration curves for drug binding to erythrocyte ghosts at pH 7.4 in PBS solution and 37°C. The concentration of ghosts was 40% (v/v) initially and in the range of  $2.029 - 2.111 \times 10^{-5} \text{ M}$  finally by lowry method with HSA as a standard. Points show every three experimental data estimated from single titration; CPZ (●), PMZ (■), FA (○) and MA (□).

造の破壊を誘発したことに多分に起因する。他方、アニオン性薬物FAやMAの場合は単相性の発熱的で、濃度の増加に伴い結合熱量の増大が続いた。

いま、結合反応は結合部位数 $n$ の独立系で起こるとして、たん白質1モル当たりの結合薬物モル数を $r$ 、結合が完全に飽和した結合部位のたん白質1モル当たりの結合熱量を $W_m$ とすると、たん白質結合のScatchard式は

$$r/D_f = n \cdot K - r \cdot K \quad (6)$$

$r = n \cdot W_r / W_m$ ,  $D_f = D_t - n \cdot P_t \cdot W_r / W_m$ であるから

$$W_r / D_f = W_m \cdot K - W_r \cdot K \quad (7)$$

となる。Fig. 5に、Fig. 4のデータから求めた式(7)の熱量Scatchardプロットを示した。 $W_m$ と $K$ の最適値を繰返し最小二乗法で計算したところ、CPZとPMZはFig. 4の第1相と第2相において、共に直線性があり、結合部位は特異的な1種類のみであった。しかし、FAとMAは曲線性があり、ゴースト結合部位は2種類であることが分かった。

熱量滴定カーブの直接あてはめ計算で得た結合パラメータと熱力学的パラメータをTable 1にまとめた。自由エネルギー変化( $\Delta G$ )は $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K$  ( $R$ :気体定数,  $T$ :絶対温度)から、エントロピー変化( $\Delta S$ )は $\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T$ から求めた。

カチオン性薬物CPZとPMZは、1種類だけの結合部位数 $n = 2 \sim 3$ 、結合定数 $K = (1.26 \sim 6.0) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ によって膜に結合しており、小さい負の $\Delta H$ と大きい正の $\Delta S$ が特徴的であった。アニオン性薬物FAとMAは2種類の結合部位に結合が起こった。第1種結合部位は親和性が高く( $K_1 = 10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ )、しかし結合許容力が低く( $n_1 = 1$ )、大きい負の $\Delta H$ と正の $\Delta S$ によって特徴づけられた。第2種結合部位は親和性は低いが( $K_2 = 10^3 \text{ M}^{-1}$ )、結合許容力が高く( $n_2 = 6$ )、負の $\Delta S$ をもつのが特徴的であった。

一般に、疎水性相互作用では大きい正の $\Delta H$ と正の $\Delta S$ の寄与が強いが、van der Waals' 相互作用や、イオン

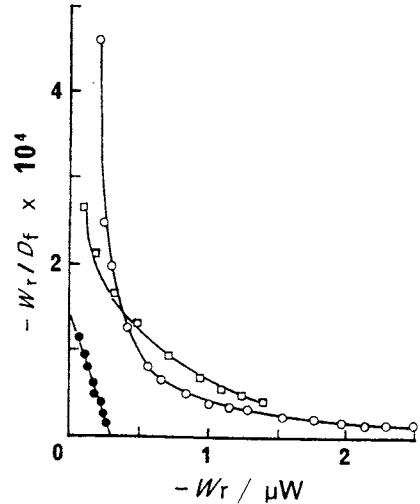


Fig. 5 Scatchard plots of calorimetric data. Each data point represents a mean value of three experiments in Fig. 4 and lines are fitted by a non-linear least squares method. The concentrations used were 0.01 – 0.3 mM for CPZ and PMZ, and 0.01 – 1.0 mM for FA and MA. Binding parameters,  $K = 5.974 \times 10^4 / \text{M}$  and  $W_m = -0.28 \mu\text{cal/sec}$  for CPZ,  $K = 2.013 \times 10^4 / \text{M}$  and  $W_m = -0.23 \mu\text{cal/sec}$  for PMZ,  $K_1 = 1.288 \times 10^5 / \text{M}$ ,  $K_2 = 0.761 \times 10^3 / \text{M}$ ,  $W_{m1} = -0.30 \mu\text{cal/sec}$  and  $W_{m2} = -3.5 \mu\text{cal/sec}$  for FA and  $K_1 = 1.299 \times 10^4 / \text{M}$ ,  $K_2 = 0.870 \times 10^3 / \text{M}$ ,  $W_{m1} = -0.61 \mu\text{cal/sec}$  and  $W_{m2} = -1.1 \mu\text{cal/sec}$  for MA, were used for initial values of the analysis of calorimetric titration curves. For units  $4.184 \text{ cal/sec} = 1.0 \text{ J/sec}$ .

Table 1 Binding and thermodynamic parameters for drug binding to human erythrocyte ghosts at 37°C.

Drugs	$m$	$K$ ( $10^4 \cdot \text{M}^{-1}$ )	$n$	$-\Delta H$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$-\Delta G$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$\Delta S$ ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{deg}^{-1}$ )
CPZ		5.959	2.5	5.774	28.35	72.8
PMZ		1.180	2.2	4.602	28.17	63.2
FA	1	11.07	0.9	20.85	29.94	28.9
	2	0.1014	6.4		17.84	-9.6
MA	1	2.991	1.2	18.28	26.56	26.8
	2	0.1826	10.0		19.36	-3.3

性結合（低誘電率溶媒中）または水素結合形成では負の $\Delta H$ および負の $\Delta S$ が起るとされている<sup>25)</sup>。したがって、カチオン性薬物と膜との結合では、薬物と膜の脂質層あるいは膜の疎水性たん白質との間に、強い疎水性相互作用が働いている。他方、アニオン性薬物では、その結合プロセスにおいて、疎水性相互作用ばかりでなく、イオン性相互作用やvan der Waals' 相互作用が大きく寄与している。FAやMAの結合において、カルボキシルアニオン負電荷と膜のバンド3たん白質<sup>26)</sup>正電荷との中和体が疎水性相互作用の起因である。

等張PBS中において、薬物誘発溶血の開始濃度 $C_1$ と50%溶血濃度 $C_{50}$ における $r_1$ と $r_{50}$ を、Fig. 4に示した熱量滴定カーブのデータから式(1)により求め、ゴースト結合部位における結合飽和度を $r/n$ 比(%)で比較した(Table 2)。その結果、イオン性薬物はすべて溶血開始濃度において第1種結合部位が飽和されていた。しかし、アニオン性薬物FAとMAの第2種結合部位はなかなか飽和に達せず、 $C_{50}$ 以上の溶血濃度を必要とした。

3.3 赤血球細胞およびゴースト膜への薬物の取り込み

等張PBS中において、赤血球細胞へのCPZ (0.05 mM, 37°C) およびFA (0.1mM, 25°C) の取り込み速度は非常に速く(Fig. 6), インキュベーション5minで平衡に達した。平衡状態における赤血球細胞への取り込み率は、CPZ 27.7%およびFA 12.3%であった。これらの%は薬物の初期濃度や温度には全く無関係であった。取り込み薬物量はCPZ  $0.0385 \pm 0.029$  およびFA  $0.171 \pm 0.012$  fmol  $\cdot$  cell<sup>-1</sup>となった。この結果は溶血プロセスが能動移行では起こらないことを示す。

赤血球細胞への薬物取り込みは薬物分子が細胞膜層内部に侵入するのか、あるいは膜表面に結合蓄積するのかを確かめるため、細胞内薬物濃度に対する膜結合薬物濃度の分配比を求めた(Fig. 7)。CPZとFA (0.01~0.5 mM) のゴースト膜に進入した濃度比を膜内残留放射能

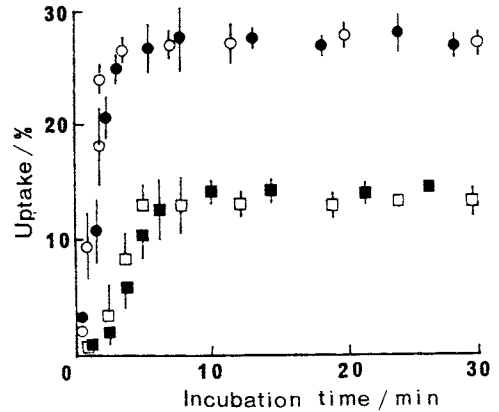


Fig. 6 Percent uptake of FA and CPZ into human erythrocyte cells suspended in a medium with hematocrit of 2.0 at 37°C. Initial concentrations of FA and CPZ in the medium were 0.1 and 0.5 mM, respectively. Closed and open symbols show the uptake at 25°C and 37°C, respectively. CPZ (○, ●), FA (□, ■).

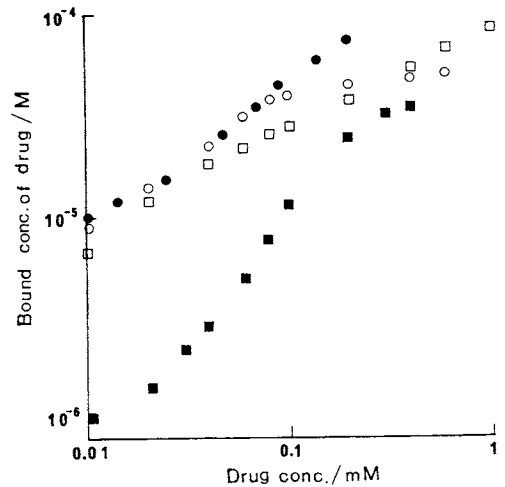


Fig. 7 Bound and penetrated concentrations of CPZ and FA to erythrocyte ghosts. Closed and open symbols show the amount of bound drug calculated from the calorimetric data using the values of the parameters given in Table 1 and the amount of penetrated drug obtained from the experiments of uptake into erythrocyte ghost membranes by using labeled drug as a tracer at 37°C. CPZ (○, ●), FA (□, ■).

Table 2 Hemolytic concentrations ( $C_1$  and  $C_{50}$ ) and amount of bound drug to human erythrocyte ghosts ( $r_1$  and  $r_{50}$  at  $C_1$  and  $C_{50}$ , respectively) at 37°C.

<i>m</i>	$C_1$ mM	$r_1^*$	$r_1/n$ %	$C_{50}$ mM	$r_{50}^*$	$r_{50}/n$ %	
CPZ	0.25	0.280	92.4	0.52	0.293	96.6	
PMZ	0.84	0.250	90.4	1.27	0.250	90.4	
FA	1	0.70	0.163	98.7	1.45	0.164	99.4
		2	0.459	39.6	0.674	58.2	
MA	1	1.70	0.290	98.1	1.70	0.293	99.0
		2	1.264	73.6	1.469	85.4	

\* $10^{-16}$  mol  $\cdot$  cell<sup>-1</sup>

活性と結合熱量からの値で求めると、CPZでは両者の値は良く一致し、細胞取り込みCPZ濃度は溶血開始濃度までは薬物濃度に比例して増大し、ゴースト膜結合薬物濃度にはほぼ等しかった。すなわち、C.Zなどのカチオン性薬物は細胞膜層に結合しないしは進入していることを示す。しかし、FAでは溶血開始直前の細胞取り込み濃度が、ゴースト結合濃度の約15%程度を過ぎず、薬物飽和濃度に至るまで取り込みと結合との濃度差は続いた。すなわち、FAなどのアニオン性薬物は細胞膜層よりも膜表面にのみに結合していることを示す。

### 3.4 薬物誘発溶血のメカニズム

赤血球は *in vitro* で種々の化学的および物理的要因によって容易にその形状を変える。この変形には外方突出 (crenation) と内方陥没 (inavigation) がある (Fig. 8) crenationでは、正常な円盤形から球形 (discocyte) に変わると共にトゲ形 (spherocyte) を経由して球状細胞に移行する。また、inavigationでは円盤の片面が深くくぼんでカップ状細胞になり、stomatocyteを経由してspherocyteに移行する。*in vivo* で見られる異常形態はいずれかに類する。溶血作用は一般に赤血球細胞結合、細胞膜揺らぎ、溶血のステップで生起するが、CPZなどのカチオン性薬物の溶血誘発ではechinocyteを経由するinternalizationが起こり、FAなどのアニオン性薬物ではstomatocyteを経由するexternalizationである<sup>6-9)</sup>。

薬物誘発による赤血球の変形について、Sheetz & Singer<sup>7)</sup> のbilayer couple 仮説があり、赤血球の膜脂質二重層は外層部よりも内層部にホスファチジルセリン

などの酸性リン脂質が局在するため、カチオン性薬物は内層部に多く進入し、内層のみを膨張させてstomatocytecrenationを生じ、アニオン性薬物は反発作用のため、外層部に多く進入して外層のみを膨張させてechinocyteinavigationを生じる (Fig. 8)。しかし、人工リン脂質膜ではCPZの有意な濃度集中はまだ証明されていない<sup>27)</sup>。

この仮説も参考にし、本研究の結果を総合すると、Fig. 9に示す薬物誘発溶血メカニズムが考えられる。すなわち、カチオン性薬物のinternalizationでは薬物分子は膜脂質二重層に結合するか、あるいは進入すると、低薬物濃度では抗溶血の安定化作用を示すが、これは薬物分子と膜の疎水性部分であるリン脂質の脂肪酸分子鎖との間で疎水性結合を形成するためである (Fig. 9 [a])。そして、薬物が高濃度に至ると、薬物分子は脂肪酸部分へ過剰に蓄積し、膜は分裂し、ついに溶血を生起する (Fig. 9 [b])。他方、アニオン性薬物のexternalizationでは薬物分子は膜表面外層部に局在するたん白質部分と結合し、イオン性結合あるいは水素結合を形成することによって、アニオン移動の障壁あるいは阻止部分となる (Fig. 9 [c])。そして、薬物はいったん第1種結合部位の結合を飽和してしまうと、過剰の薬物が第2種結合部位の結合へと膜内層部まで進入することによって溶血する (Fig. 9 [d])。

## 4. 結論

ヒト赤血球細胞膜に対するイオン性薬物反応の特異的差異を考察するため、カチオン性薬物であるクロロプロ

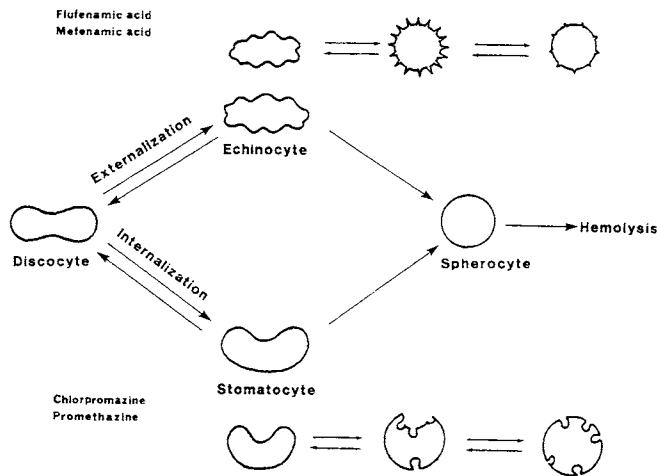


Fig. 8 Two typical types of shape changes of human erythrocytes induced by drugs.

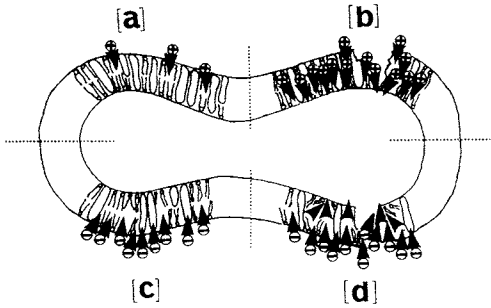


Fig. 9 Proposed actions of drugs on the erythrocyte cell membrane; cationic drug (+) and anionic drug (-).

マジンおよびプロメタジン, ならびにアニオン性薬物であるフフェナム酸およびメフェナム酸が誘発する溶血現象について, 薬物と赤血球膜との相互作用のカロリメトリー, および薬物の赤血球細胞への取り込みを比較検討した。その結果, (1)すべてのイオン性薬物と赤血球との結合反応は発熱的に自然に生起し, 負の $\Delta H$ と負の $\Delta G$ で示された。溶血が開始し, 細胞膜構造の破壊が進行すると, 反応は吸熱的に反転した。そのときのヘモグロビンの溶出 $\Delta H_{hem}$ は $20 \pm 1.0 \text{ pJ} \cdot \text{cell}^{-1}$ であった。(2) 薬物と赤血球膜との間の相互作用については, カチオン性薬物は膜内層部に高い親和性を持ち, 結合あるいは進入が起こった。反応は小さい負の $\Delta H$ と大きい正の $\Delta S$ が特徴的であり, 薬物とリン脂質との疎水性相互作用の寄与によるものである。これに対して, アニオン性薬物は膜外層に2種類の結合部位をもち, 強い結合部位の結合定数は $K=10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ であるが, 弱い結合部位は $K=10^3 \text{ M}^{-1}$ であるから, 疎水性およびイオン性の両相互作用により結合している。(3)アニオン性薬物の赤血球膜内の進入は薬物結合量の約15%にすぎず, 薬物の第1結合部位での結合は溶血開始直前においてすでに飽和状態にあり, 引き続き第2結合部位での結合が溶血に重要な役割を演ずる。(4)イオン性薬物誘発溶血のメカニズムについて次のことが考えられた。i)カチオン性薬物の誘発溶血は薬物がただちに赤血球膜内に結合あるいは進入し, 膜脂質二重層を破壊することによる。ii)アニオン性薬物は赤血球膜表面に結合し, ラグタイム中に結合が飽和するとはじめて溶血を誘発する。(5)今後, 未知の薬物を用いた溶血の場合でも, 熱測定をすれば吸熱, 発熱の検出のあり方で溶血の誘発プロセスが予測できる。

References

- 1) A.D. Ingold and E. Woln, *Biochem. Pharmacol.* **17**, 269 (1968).
- 2) J. Santos-Marfiner, T.A. Aviles and J.A. Laboy-Torres, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **196**, 83 (1972).
- 3) P. Seeman, *Pharmacol. Rev.* **24**, 583 (1972).
- 4) S.K. Kain and P. Hochstein, *Biochim. Biophys. Acta* **586**, 128 (1979).
- 5) M.R. Lieber, Y. Lange and T.L. Steck, *J. Biol. Chem.* **259**, 9225 (1984).
- 6) N. Mohandes and C.A. Feo, *Blood Cells* **1**, 375 (1975).
- 7) M.P. Sheetz and S.J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4437 (1974).
- 8) B. Isomma, H. Hagerstrand and G. Paatter, *Biochim. Biophys. Acta* **899**, 93 (1987).
- 9) A. Nwafor and W.T. Coakley, *Biochem. Pharmacol.* **35**, 953 (1986).
- 10) T. Ogiso, M. Ewaki and K. Mori, *Biochem. Biophys. Acta* **649**, 325 (1981).
- 11) M.H. Bickel, *J. Pharm. Pharmacol.* **27**, 733 (725).
- 12) A. Lund, *Acta Pharmacol. Toxicol.* **47**, 300 (1980).
- 13) C.A. Cruze and M.C. Meyer, *J. Pharm. Sci.* **65**, 33 (1976).
- 14) A. Tamura, F. Kawase, T. Sato and T. Fujii, *J. Pharm. Pharmacol.* **39**, 740 (1987).
- 15) M. Yamamoto and H. Aki, *J. Biochem. Biophys. Methods* **16**, 271 (1988).
- 16) H. Aki and M. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.* **39**, 396 (1990).
- 17) H. Aki and M. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.* **41**, 133 (1991).
- 18) H. Aki and M. Yamamoto, *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 637 (1990).
- 19) H. Aki and M. Yamamoto, *J. Pharm. Pharmacol.* **41**, 675 (1989).
- 20) J.T. Dodge, C. Mitchell, D.Y. Hanahan, *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 119 (1963).
- 21) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randoll, *J. Biochem. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 22) G. Holzworthe and P. Doty, *J. Am. Chem.*



- Soc.* **87**, 218 (1965).
- 23) R. Strom, P. Caiafe and B. Mondovi, *Biochemistry* **11**, 1908 (1972).
- 24) M. Yamamoto and H. Aki, *Yakugaku Zasshi* **101**, 443 (1982).
- 25) P.D. Ross and S. Subraminian, *Biochemistry* **20**, 808 (1981).
- 26) J.L. Cousin and R. Motais, *Biochim. Biophys. Acta* **687**, 156 (1982).
- 27) M.J. Conrad and S.J. Singer, *Biochemistry* **20**, 808 (1981).

## 要 旨

カチオン性薬物のクロルプロマジン(CPZ), プロメタジン(PMZ), アニオン性薬物のフルフェナム酸(FA)およびメフェナム酸(MA)のヒト赤血球の溶血, 膜結合および細胞内への取り込みを比較した。イオン性薬物のヒト赤血球との結合作用は自然的, 発熱的に起き, 溶血と膜破壊の開始で反応は吸熱的に反転した。CPZ と PMZは赤血球膜内層に高い親和力で結合あるいは進入した。この作用は薬物と膜リン脂質の疎水性相互作用の寄与による, 小さい負のエンタルピー変化と大きい正のエントロピー変化が特徴である。FAとMAに対して, 膜はイオン性と疎水性両相互作用による2種類の結合部位を有した。イオン性薬物誘発の溶血メカニズムを提案した。