

論文の内容の要旨

論文題目：アルブミン-ヘムを用いる酸素輸液の展開

氏名：中川 晶人

本論文は、何時でも何処でも、血液型に関係なく呼吸に充分量の酸素を生体内に供給できる人工酸素運搬体(酸素輸液)に関する研究成果のまとめである。事故や災害による出血性ショックのため、生命維持が危ぶまれる時、効果的な救命法は輸血(赤血球製剤の投与)であるが、感染症や合併症、短い保存期間(3週間)などの未解決課題も多い。酸素輸液が完成すれば、輸血代替としてだけでなく、災害時の危機管理対策においても重要な役割を果たすことは間違いない。これまでも、多数の酸素輸液が開発されてきており、そのほとんどは動物由来の赤血球から精製したヘモグロビン(Hb)を利用しているが、Hbでなくとも、その酸素配位活性中心であるポルフィリン鉄(ヘム)を修飾した誘導体のみでも、Hbと同様に水中で酸素を結合解離することができる。テトラフェニルヘム(FeTPP)に両親媒性の置換基と軸塩基配位子を導入した誘導体(リポドヘム)や、ヒト血清アルブミン(HSA)に包接した複合体(アルブミン-ヘム、**Figure 1**)は、水中(pH 7.3, 37°C)で赤血球と同等の酸素運搬能を発揮する。

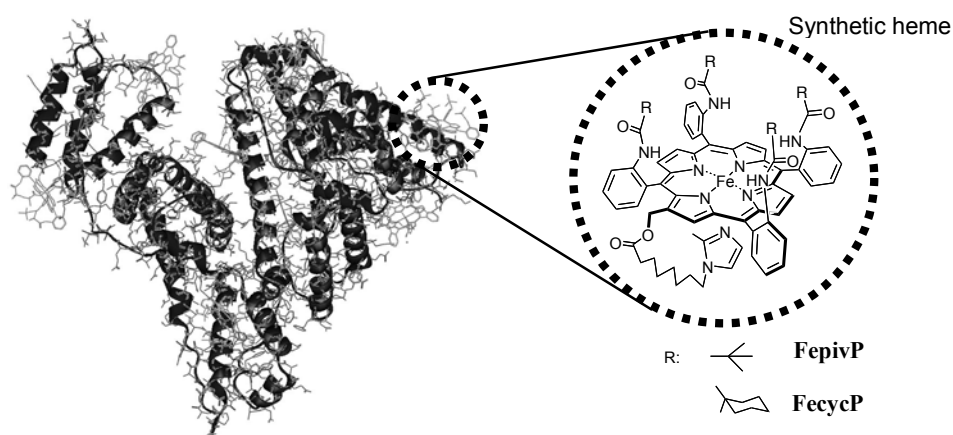


Figure 1. Albumin-heme.

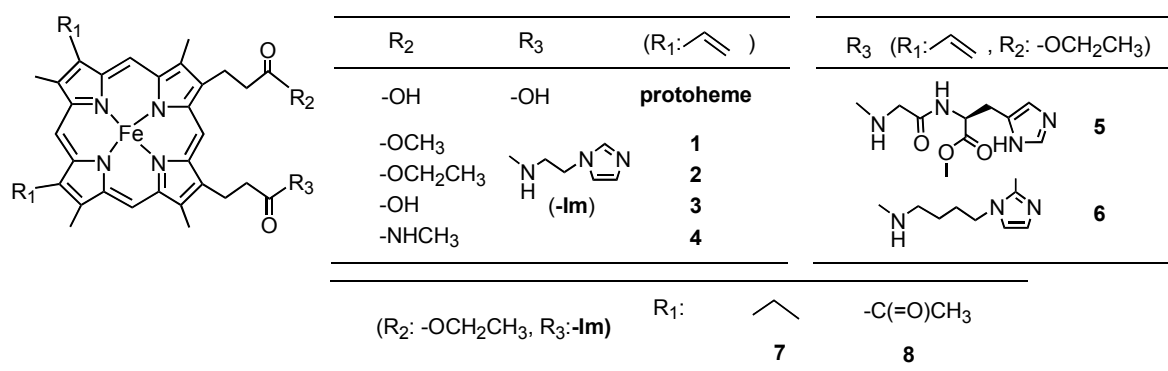
筆者は、リポドヘムおよびアルブミン-ヘムを酸素輸液として展開するために、先ずそれらの酸素配位構造、酸素運搬能を解明、ヘム構造と酸素配位能の相関を明らかにするとともに、動物実験からアルブミン-ヘムの生体内酸素輸送能を実証した。

1. アルブミン-ヘムの酸素配位構造と運搬能

窒素雰囲気下におけるアルブミン-ヘムの磁気円偏光二色性スペクトルは、5配位Fe(II)高スピン錯体の形成を示し、そこへ酸素を通気すると、6配位Fe(II)低スピン錯体(酸素錯体)型へ変化した。さらに赤外吸収スペクトルから、配位酸素の伸縮振動を 1158 cm^{-1} に観測、アルブミン-ヘムは酸素をend-on型で結合していることを明らかにした。また、酸素結合解離に伴う可視吸収スペクトル変化から算出した酸素親和度(P_{50})は、35Torrであった(37°C)。酸素結合解離に協同性はないが、肺(110Torr)-末梢組織(40Torr)間の酸素分圧差から計算される酸素運搬効率は赤血球と同じ22%であり、生体内で効率よく酸素輸送できる可能性が示された。

2. プロトヘムを利用した新しいアルブミン-ヘムの合成と酸素配位能

Hb の酸素配位活性中心であるプロトヘムに軸塩基配位子を導入した誘導体(1-8, **Formula 1**)の HSA 複合体を設計・合成した。プロトヘムと同じ代謝経路をたどる安全な酸素輸液が得られると期待できる。



Formula 1. Protoheme derivatives.

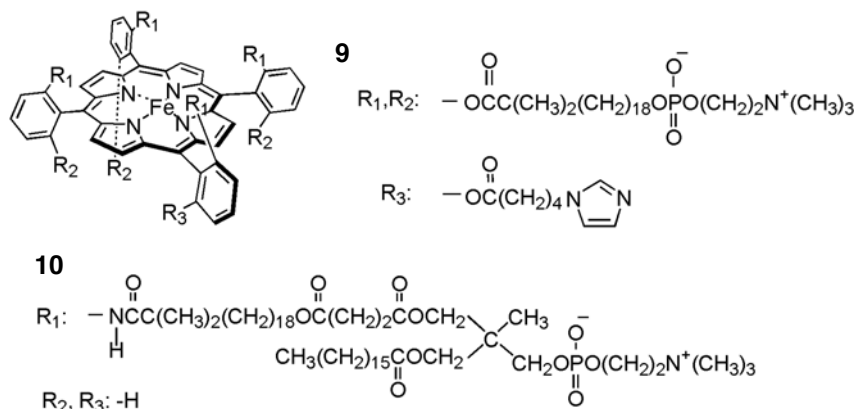
プロトヘム誘導体(例えば **2**)はプロトポルフィリンに Benzotirazol-1-yloxytris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate を用いて 1 段階で軸塩基配位子と疎水性置換基を導入後、中心鉄を挿入し合成した。このエタノール溶液を HSA 水溶液と混合し、エタノールを除去、HSA 複合体を得た。この水溶液に酸素を通気すると、スペクトルは酸素配位型を示した。界面活性剤を用いて **2** を水中に可溶化させた場合や、HSA にプロトヘムのみを包接した系では、酸素錯体が生成しないことから、**2** は HSA の疎水ドメインへ包接され、2 量酸化が抑止されるために、酸素錯体が形成できたものと考えられる。さらに、疎水性、軸塩基配位子の構造、ポルフィリン環の電子密度が異なる一連のヘム誘導体を合成し、HSA 複合体の P_{50} 、酸素錯体半減期($\tau_{1/2}$)を測定した。**3** や **4**、2-メチルイミダゾールを導入した **6** は酸素錯体を形成しない。**3** や **4** は親水性が高く、HSA に包接され難いこと、**6** の場合、軸塩基配位子が脱離しやすいことが原因と考えられる。**7** との HSA 複合体は酸素錯体型スペクトルを示したようにも見えたが、経時変化がなかったこと、Soret 帯の吸光度が若干上昇した(通常は酸化に伴い吸光度が減少することから、これは酸素錯体ではないと結論した。**1**、**2**、**5**、**8** の HSA 複合体は、酸素通気により酸素錯体を形成した。 P_{50} は **1**、**2**、**5** と同じ値(0.1 Torr)であったが、**8** の P_{50} は 0.4 Torr

で、プロトヘム系に比べると大きい。ジアセチルデューテロポルフィリンの pK_3 (3.3)はプロトポルフィリンの値(4.8)に比べて低く、ビニル基からアセチル基への変換が酸素への電子供与を低減し、その結果、 P_{50} が増大したと考えられる。 $\tau_{1/2}$ は HSA-1 (20 min) < HSA-2 (50 min) = HSA-8 (50 min) < HSA-5 (90 min)の順であった。ポルフィリン環の電子密度低下が、酸素錯体の安定度を上昇させると考えられる。

これまで、安定酸素錯体を生成するアルブミン-ヘムの条件は、FeTPP 誘導体のように酸素配位座近傍に嵩高い置換基を有するヘムに限られていたが、プロトヘム誘導体でも HSA への包接により、水中で酸素を結合解離できることを初めて明らかにすることができた。さらに、ポルフィリン環および軸塩基配位子の塩基性の調整により、適度な酸素親和度を有する HSA 複合体が得られる可能性が示唆された。

3. リピドヘム集合体の構造と酸素結合能

リピドヘムは水中で自己集合してミセルや小胞体を形成し、酸素を結合解離できるが、過剰な軸塩基配位子を共存させる必要があるため、集合構造や酸素錯体の安定度を低下させる原因に繋がる。そこで、分子内に軸塩基配位子やジアルキルホスホコリン基を共有結合したリピドヘム誘導体(Formula 2)を合成し、置換基が集合形態、酸素配位能に及ぼす影響を明らかにした。



Formula 2. Lipidheme derivatives.

軸塩基配位子と 7 つのアルキルホスホコリン基を導入した **9** は、水中で自己集合して、球状ミセルを形成する。透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡観察の結果から、テトラフェニル環オルト位に結合したエステル置換基を含むポルフィリン部が会合し、二量体構造を形成していると推察される。得られた **9** 水分散液に酸素を通気すると、安定な酸素錯体が得られ、その結合解離は可逆的であった。25°C における P_{50} は 8 Torr で赤血球の値 (8.8 Torr) にほぼ等しく、 $\tau_{1/2}$ は 11hr であった。**9** は、水相系で酸素を可逆的に吸脱着できる最小構造のポルフィリン鉄組織体である。一方、ジアルキルホスホコリン基を導入した **10** は、水中で粒径約 100 nm の 2 分子膜小胞体を形成する。酸素分圧に応答して可逆的に酸素を結合解離可能で、 $\tau_{1/2}$: 1 週間(37°C)の非常に安定な酸素錯体が得られた。 P_{50} は 30 Torr、酸素運搬効率は 22%であり、赤血球に匹敵する。アルキルホスホコリン基の親疎水バランスを制御して、安定度の高い酸素錯体形成を実現することが出来た。

4. 光を利用した鉄(III)ポルフィリン(ヘミン)の酸素配位能の復元

LMCT(Ligand-to-Metal Charge Transfer)帯の光励起による分子内電子移動反応を利用して、還元剤を添加することなくリピドヘムおよびアルブミン-ヘムの酸素結合能を復元する方法を確立、その反応機構について検討した。対ハロゲンイオンの電気陰性度増大($\text{I}^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^-$)に伴い、酸化したリピドヘムの紫

外部における極大吸収波長が低波長側に移行することから、Fe(III)-Cl⁻間のLMCT吸収帯を362 nmと帰属した。この溶液をアルゴン雰囲気、糖質(ヒアルロン酸)共存下で光励起(365 nm)すると、Fe(II)5配位錯体が生成した。これは生成するラジカルを共存糖質が効率良く捕捉し、再酸化反応が抑止されたためと考えられる。そこに酸素を通気すると、酸素錯体が得られた。アルブミン-ヘムの場合、λ_{max}: 330 nmをLMCT吸収帯と帰属、興味深いことにラジカル捕捉剤を共存させなくとも、光還元反応が進行した。

これはHSAのアミノ酸残基がその役割を担い、逆電子移動反応を抑止するためと推測される。光還元反応初期の量子収率は0.01であり、レーザーフラッシュホトリシス法から、光還元反応は100 ns以内に進行することを明らかにした。

以上の結果から、光還元の反応機構を考察した(**Figure 2**)。LMCT帯の光照射により、ヘミンがLMCT*へ遷移。この状態はS₂へ失活しうると考えられ、これが還元反応との競争になる。中心鉄が還元されると、解離したクロライドラジカルがヒアルロン酸またはHSAに捕捉され、還元反応が不可逆となる。つまり、S₂への失活と逆電子移動反応が低い量子収率の原因と考えられる。

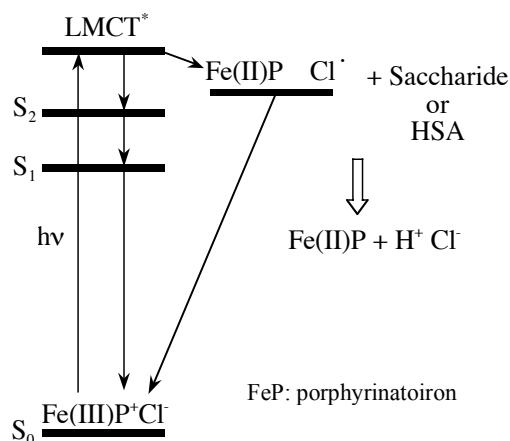


Figure 2. Proposed transient states and interconversion pathways for photoreduction of albumin-heme.

5. アルブミン-ヘムの生体内酸素輸送能

アルブミン-ヘム溶液を生体内へ投与した場合、Hb製剤に見られる副作用(急激な血圧上昇)は全く観測されなかった(**Figure 3**)。腸間膜の微小循環動態観測からも細静脈・細動脈の血管径が一定であることを明らかにした。これは大きな負の表面電荷(等電点: 4.8)を持つアルブミン-ヘムが、血管内皮細胞表面との静電反発により血管内皮から漏出し難く、血管弛緩因子(一酸化窒素)を捕捉しないことに起因すると考えられる。

さらに麻酔下ラット出血モデルを作成し、アルブミン-ヘムの生体内酸素輸送能を評価した。具体的には、全血液量の70%をHSAで希釈後、さらに全血液量の30%を脱血し、直ちに同量のアルブミン-ヘムまたはHSAを静注、投与後60分までの血液ガス、循環系パラメータ、腎皮質酸素分圧を測定した。HSA投与群では、血圧、腎皮質酸素分圧の回復を認めず、投与30分後には全例が死亡した。一方、アルブミン-ヘム投与群では、投与直後に血圧が初期値の70%、腎皮質酸素分圧が85%まで上昇、60分後でもその値を維持し、アルブミン-ヘムによる救命効果と生体内酸素輸送能が実証できた。また、¹²⁵Iでラベル化したアルブミン-ヘムを用いて測定したHSAおよびヘムの血中滞留時間は、それぞれ消失相で14時間、50分であり、血中から消失したヘムは肝臓へ移行した。これらの結果は、アルブミン-ヘムが出血性ショックからの蘇生液として有効であることを示している。

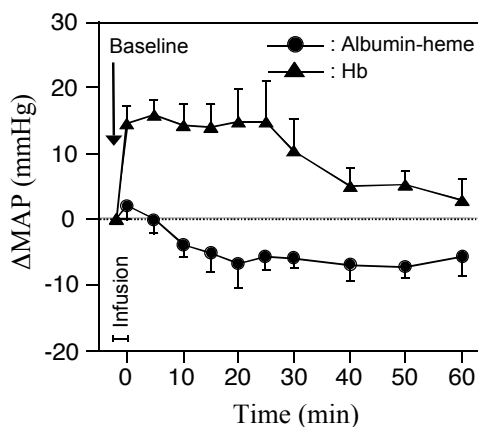


Figure 3. Changes in mean arterial pressure (MAP) after the administration of albumin-heme solution in the anesthetized rats (n=5, significant difference from baseline: p<0.05). Basal value of MAP is 90.1 ± 3.0 mmHg. All data are expressed as mean ± standard error.