

ヘモグロビンによる酸素運搬と全合成モデル

早稲田大学理工学部

西 出 宏 之

1. ヘモグロビンの酸素運搬機能

ヘモグロビン (Hb) は酸素分子の結合部位となる鉄 (II) プロトポルフィリン IX (ヘム) を含む複合タンパク質である。Hb の水溶液に酸素を接触させると、酸素分子が 1 : 1 でヘムに結合し (式(1)), デオキシ状態からオキシ状態となる。この酸素の結合反応は選択的で迅速かつ可逆的である。1 モルの Hb (4 個のヘムを含む) は 4 モルの酸素分子と結合するので、1 g の Hb (分子量 66,450) は 37°C, 大気圧下で酸素 1.34ml と結合する能力がある。ヒト血液 100ml 中に Hb 含量 15 g として、酸素 20.1ml を吸収できる。血漿中に物理溶解する酸素量 0.3ml とあわせて、血液 100ml 中に溶解している酸素量は 20.4ml である。すなわち血液は大気下で物理的に溶けうる酸素の約 70 倍の酸素を保持している¹⁾。

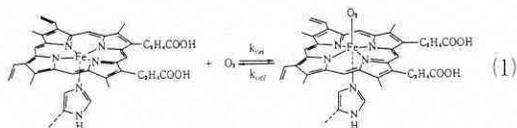


図 1 のような Hb の酸素結合平衡曲線が描かれ、酸素分圧に応じたこの吸脱着によって、Hb は肺から末梢への循環に際して酸素を運搬すると説明される。Hb の酸素との親和性は P_{50} 値 (Hb のヘムの半量が酸素結合する酸素分圧値) で比較される。赤血球中の Hb, ミオグロビンの P_{50} 値はそれぞれ 28, 0.1mmHg であり、前者の値が酸素運搬体に適していると読み取る。

この P_{50} 値は式(1)の平衡反応の定数 K の逆数である。平衡定数はその定義により、式(1)の右向き (酸素結合) 反応の速度定数 k_{on} および左向き (酸素脱着) 反応の速度定数 k_{off} の比 $K = k_{on}/k_{off}$ である。Hb のそれぞれの速度定数は、 $k_{on} = 2.9 \times$

$10^6 \text{ l/mol} \cdot \text{sec}$, $k_{off} = 1.8 \times 10^2 \text{ sec}^{-1}$ と測定されており、 $K = 1.6 \times 10^4 \text{ l/mol}$, さらに $P_{50} = K^{-1} = 28 \text{ mmHg}$ と換算される。すなわち Hb の酸素の結合と Hb からの酸素の脱着は極めて迅速であり (k_{on}, k_{off} は極めて大きな値, 脱着反応ですら 10 ミリ秒でほぼ完了), 両方向の割算の値が平衡点 (親和性) として表示されている訳である。Hb は常に結合, 脱着を高速で繰り返しており (決して同じ酸素分子を固く保持しているのではなく), Hb 近傍の溶液と酸素をキャッチボールしながら流動し, 溶存する酸素の濃度 (酸素分圧) に応答して瞬時に (少なくとも Hb の近傍では) 酸素を供給・取り込んでいる事実を強調しておきたい。

Hb により運搬・放出された酸素は Fick の拡散則 (移動量 = 拡散定数 \times 濃度勾配) に従って、酸素濃度のより低い箇所へ拡散していく。水中での酸素の拡散定数はほぼ $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ であり、 $2 \times$ 拡散定数の平方根より、静置水中で酸素が 1 秒間に拡散移動する距離の目安は、0.1mm と算出される (これを速いと捉えるか、遅いと見るか)。ここでは血流の混合 (偏流) 具合, 毛細血管内でのレオ

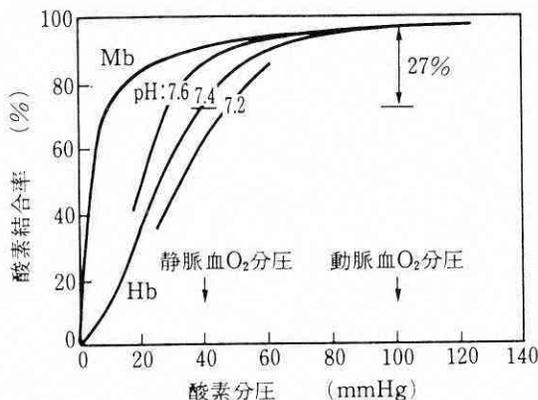


図 1 赤血球 Hb の酸素結合曲線

ロジー、管壁面に生じる境膜層での拡散抵抗などの因子を指摘するに留める。

2. 人工の酸素運搬体

複雑多岐な酵素や血液凝固系などの作用と比較するまでもなく、Hbの機能は酸素を運搬し供給するという簡明な役割なので、これを単純な物質系で再現できないかという発想は早くからあり、酸素運搬液開発への挑戦として繰り返し検討されてきた。大気下、室温で1mm立方の中に何分子の酸素が保持されているかを表1で比較してみた。Hbは優れた酸素運搬体ではあるが、他にも人工的に酸素運搬体を構成する道筋がわかる。

赤血球代替物として酸素運搬体を対象とした場合には、大気下で酸素を結合保持し、これを運搬して末梢にて効果的に放出することのほかに、要求される一次的性能として、1) 適当なコロイド浸透圧や溶液粘度、2) 適度に長い血中滞留時間(12時間以上)、3) 長期貯蔵が容易、4) ウイルスやエンドトキシンの検出なし、5) 材料各成分の低毒性、6) 大量投与しても体内代謝や排泄(非蓄積性)、などが必要である²⁾。

酸素を物理的に溶解するフルオロカーボンの乳剤が限定使用に滞っていることから、最近赤血球分画より単離精製したヒトHbを修飾して再利用する赤血球代替物が米国中心に推進され、遺伝子組み換えて産生されたHbとあわせて臨床的に最も有望視されている^{3,4)}。さらに進んで、グロビンタンパク質無しでも酸素運搬する全合成系ヘムも

表1 大気下室温で1mm立方中に存在する酸素分子の個数

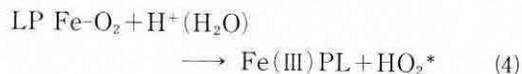
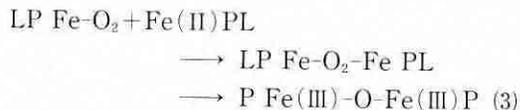
酸素ガス	2.5×10^{16}
空 気	5.0×10^{15}
水	7.2×10^{13}
ベンゼン	5.2×10^{14}
フルオロカーボン	1.5×10^{15}
ヒト血液	4.9×10^{15}
ヘモグロビン	2.2×10^{16}
合成ヘム(図1上中)	1.3×10^{18}
液化酸素(-183℃)	1.9×10^{19}

次世代型の候補となってきているので、後半では、著者らのヘムを利用する人工Hbの考え方と代表例をまとめ、今後を展望する。

3. ヘム化合物への酸素の可逆的な結合

Hbと同じように、空気から酸素分子を選択的かつ可逆的に結合(吸脱着)できる化合物はいくつか知られている。生体適合や代謝性のみならず、酸素結合の迅速さ、適度な親和力の二点からも、ヘムは極めて優れている。しかしHbから酸素結合席ヘムを単離して酸素に接触させると、水中はもちろんのこと有機溶媒中でもヘム鉄がFe(III)に不可逆酸化され、酸素分子の吸脱着はできなくなる。全合成の酸素運搬体としてヘムを扱う仕事の第一の困難さは、ヘム鉄のこの不可逆な酸化劣化反応(メト化)に原因がある。

ヘムへの酸素結合反応は、簡単に次のようにまとめられている⁵⁾。



ここでFePはヘム、Lはイミダゾールなど軸配位子である。すなわち、可逆的な酸素結合を可能とするためには、1) デオキシヘムが第5座に塩基配位子を結合した5配位構造、式(2)をとり、酸素結合(第6)座が空であること、2) オキシヘムにもう一つのヘムが結合して μ -オキシ二量体を生成する不可逆反応(式(3))を禁止すること、3) ヘムに結合した酸素分子にプロトン(水)が付加する反応(式(4))を抑制すること、の3条件を満足しなければならない。Hbでは、ヒスチジン残基のイミダゾール(近位塩基)がヘムに結合して式(1)のように1)の条件を、グロビン鎖が形成する疎水的なポケットにヘムを1分子ずつ包埋することにより2)、3)の条件が満たされ、水中でも可逆的な酸素結合を可能にしている。

このようなグロビンタンパク質鎖の役割を人工的に再現しようとする化学的な研究の結果が、ヘム面に化学的な修飾を加えた誘導体である。大まかな表現をすれば、イミダゾールがヘム下面側に結合し、上面側から酸素が結合できるよう枠組み構造を持っている(図2)⁵⁾。これらの修飾ヘムでは非プロトン性溶媒中または低温水中での酸素の可逆的結合に成功したが、生理条件下では式(4)を抑えられずいれも不可逆酸化に終わった。

4. 酸素運搬体としてのリポドヘム

リン脂質は水に容易に分散し、二分子膜の微小球リポソームを形成する。リン脂質に類似の構造を持つヘム誘導体を著者らは新しく合成し(略称リポドヘム)、リン脂質とともに水中に分散させると、ヘム誘導体がリン脂質と相溶性良く二分子膜の微小球を生成し、ヘム部は疎水層間に包埋されることを見出した(図3)⁶⁾。濃赤色の水溶液となり、生理条件下でも、長時間にわたって酸素吸

脱着の繰り返しが可能であり、水相系で酸素を運搬できるはじめての全合成系となった。

リポソーム包埋ヘムの粒径は約40nm、強靱な微小球(赤血球の1/200)である。大気下でこのヘム水溶液dl当りの酸素溶解量は20mlで、ヒト血液と比較して、酸素保持量において遜色がない(表2)。もちろん合成系であるので水溶液中のヘム濃度を高められ、例えば15mmol/lでは29ml酸素/dlを運搬できる。血液を超える酸素運搬量を実現できることは合成系の大きな利点である。

酸素の結合と脱着の速度定数 (k_{on}, k_{off}) はそれぞれ約 $10^8 \text{ l/mol}\cdot\text{sec}$, 10^3 sec^{-1} であり、Hbと同じく大変迅速である。Hb/赤血球と異なりヒル係数1であるが、酸素親和性 P_{50} 値は40~50mmHgで、適度に弱い。これらの点からも有効に作動し得る酸素運搬体である。

溶液物性にも優れており(表2)、コロイド浸透圧は低く、必要に応じてデキストランなどの添加により容易に血液と同等に調製できる。溶液は無酸素下、室温、暗所で1年以上保存可能であり、凍結乾燥粉末としても製剤できる。粉末に純水を添加すれば容易に活性なヘム溶液に再生できる。全合成系であるので、無菌、無ウイルスの保証は容易で、また均質物質として量産できる長所は言うまでもない。

静注用栄養輸液として汎用されている脂肪乳剤は、大豆油を少量のリン脂質で乳化した油滴小球

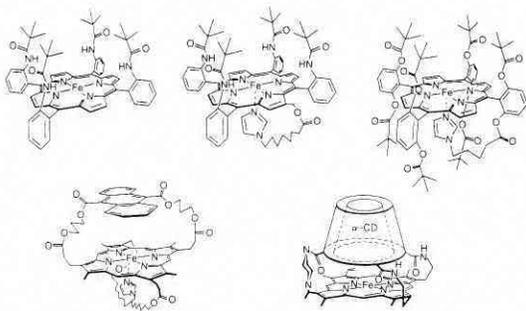


図2 Hb 活性中心モデルとしてのヘム化合物

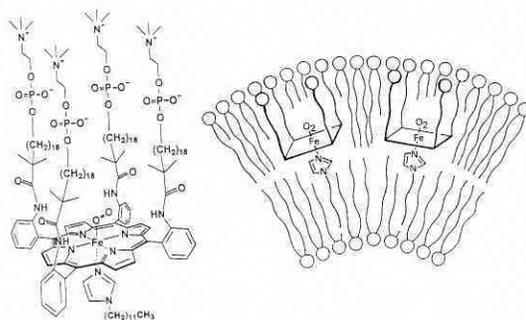


図3 リポドヘムとリン脂質リポソーム

表2 リポソーム包埋及び油滴小球型リポドヘムの溶液物性と酸素溶解量(大気下37°C)

溶液	ヘム濃度 (mM)	比重	粘度 (cP)	酸素溶解量 (mlO ₂ /dl液)
リポソーム	10	1.01	3.8	20
	15	1.02	4.4	29
油滴	5	1.00	1.1	11
	10	1.00	1.2	20
ヒト血液	9.6	1.06	4.4~5.5	23
血漿	0	1.03	1.3	0.4

リポソームは0.9%生理食塩水、油滴小球は2%グリセリン溶液に分散。浸透圧はそれぞれ295, 285mOsm/kg。両溶液は2%デキストラン(分子量4万)の添加によりヒト血液とほぼ同じコロイド浸透圧25mmHgが得られる。

の分散液である。リポドヘムは両親媒性であるので、大豆油などトリグリセリドと混合して乳化すると、トリグリセリドの小球を芯として、リポドヘムが界面活性剤（乳化剤）として小球の表面を被覆（図4）、容易に油滴小球/水の分散液を生成する。酸素結合席のヘム部が油相内に位置するため、水中でも可逆的で寿命の長い酸素結合が実現した⁷⁾。

リポドヘムとトリグリセリドの仕込み比により、粒径やヘム濃度つまり酸素溶解量を調整できる。粒径は0.1 μ mで、分散液として安定である（室温、1ヵ月以上）。その血漿混合液を超遠心分離しても、上澄み液にはヘムは検出されず、リポドヘムは油滴小球に安定に取り込まれている。溶液粘度は低く（表2）、血液と1/1混合しても2.5cPに留まり、低粘性を保つことが特徴である。酸素溶解量（表2）、親和性、結合速度など、高い性能が発揮できる。

5. 生体内酸素輸送

これらのリポドヘムの安全性は、血液代替物としては必ずしも十分ではないが、全血の半量交換の実験には支障はなかった。

出血性ショック（30m ℓ /kg）に置いたビーグル犬への静注では、血漿増量剤の補給と同様に循環動態を回復できた。混合静脈血の酸素分圧はヘム投

与後に上昇、著しく改善された。なお静脈血中の二酸化炭素分圧、pHとも回復したが、これはリポドヘムのイオン対構造に基づく緩衝作用と考えられる。

また動脈、混合静脈間の酸素供給量（消費量）は血管内のヘム濃度に一致し、ヘムの *in vivo* 酸素運搬が定量的に確認できた。リポドヘムによる供給が上積みされた分だけ、全体の酸素供給量が増加した。

Hb/赤血球による酸素輸送は、ヘムへの酸素分子の単純な結合平衡反応に基づくものであり、*in vivo* でも全合成ヘムに原則的には置き替えられる点を再度強調しておきたい。もちろん Hb の酸素結合で見られるアロステリック効果やボア効果の再現、メト Hb 還元酵素や活性酸素に対する SOD などを Hb とともに内包している赤血球としての機能、NO 捕捉や遊離 Hb ヘムの生理副作用など、まだ課題は多い。ヘム誘導体が次々に精密合成され、着実にその知見が積み重ねられている。

引用文献

- 1) 西出宏之：酸素を運ぶヘモグロビン、現代化学（1995）51.
- 2) 土田英俊, 西出宏之：血液代替物, 生体材料（1992）10, 81.
- 3) 関口定美, 仲井邦彦：人工血液の開発と臨床応用, 輸血学会誌（1995）41, 131.
- 4) Tsuchida E: Artificial Red Cells; Materials, Performances and Clinical Study as Blood Substitutes. John Wiley, New York (1995).
- 5) Tsuchida E, Nishide H: Hemoglobin model; Artificial oxygen carrier composed of porphyrinatoiron complexes. Top Curr Chem (1986) 132, 64.
- 6) Tsuchida E, Nishide H: Liposome/heme as a totally synthetic oxygen transporter. Gregoriadis G, ed. John Wiley, New York (1998), p. 569.
- 7) Komatsu T, Nishide T, Tsuchida E, et al.: Preparation and oxygen-transport of lipid heme microspheres. Artif Org Today (1993) 3, 137.

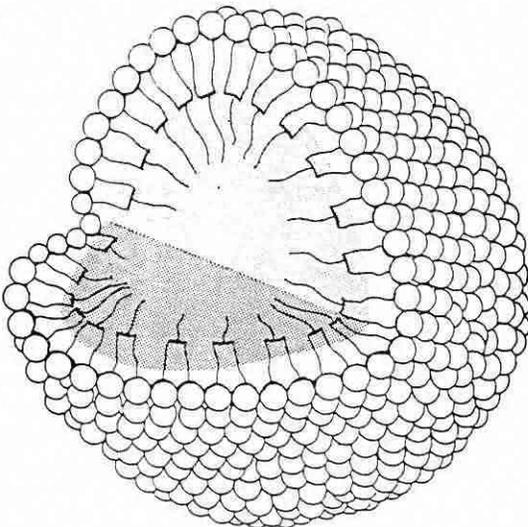


図4 リポドヘム油滴小球