

酸素輸送合成ヘム蛋白質“アルブミン-ヘム”の創製と酸素輸液の展開

小松晃之, 土田英俊

早稲田大学 理工学総合研究センター

1. はじめに

ヒト血清アルブミン (HSA) は血液のコロイド浸透圧調節に加え、種々の内因性・外因性物質を結合・輸送する役割を担う血漿蛋白質である。もし、このHSAにヘモグロビン (Hb) の酸素輸送能を付与することができれば、人工酸素運搬体 (酸素輸液) としての利用価値はきわめて高く、例えば救急医療現場における救命措置への適用を考えただけでも、その絶大な有用性が容易に想像できる。

我々はHSAの非特異的多分子結合能に着目し、一連の近位塩基結合型ヘム (Figure 1) を遺伝子組換えHSAに包接させた人工のヘム蛋白質“アルブミン-ヘム (rHSA-heme)”を合成、それが生理条件下でHbと同じように酸素を吸脱着できる酸素運搬体として機能する (酸素輸液となる) こと明らかにした^{1,6)}。ヘムはアルブミン1分子当たり最大8分子まで包接可能。得られたrHSA-heme溶液の粘度、コロイド浸透圧、等電点はヘムの結合数によらず一定で、ヒト血液との適合性も高い⁷⁾。また、酸素親和性はヘムの化学構造を変化させることにより調整できるなどの利点もある^{5,6)}。

本報では、rHSA-hemeの特徴と、それを利用した酸素輸液の展開について、最新的话题を紹介したい。

2. 酸素結合能

赤色のrHSA-heme水溶液は室温で2年以上保存可能な安定度の高い製剤である。窒素雰囲気下におけるrHSA-heme水溶液の可視吸収スペクトルパターンは、活性中心であるヘムがFe(II)5配位高スピン錯体であることを示し、これはHbのdeoxy体に相当する。そこへ酸素を通気すると速やかに酸素錯体 (oxy体) が形成され、その酸素結合解離は可逆的に観測できる。赤外吸収、共鳴ラマン、磁気円偏光二色性スペクトルから、酸素配位錯体の電子状態を詳細に解析した²⁾。十数種類のヘム誘導体を対象に行った立体構造と酸素結合能の相関解明から、4つのシクロヘキサノイル基を有するヘムを包接したrHSA複合体が、最も安定な酸素錯体を形成できることを明らかにした⁵⁾。酸素親和性 (P_{50}) は30~36Torrで赤血球 (P_{50} : 27 Torr) に近く、酸素錯体半減期 (τ_{50} : 9 hr) はミオグロビンの値

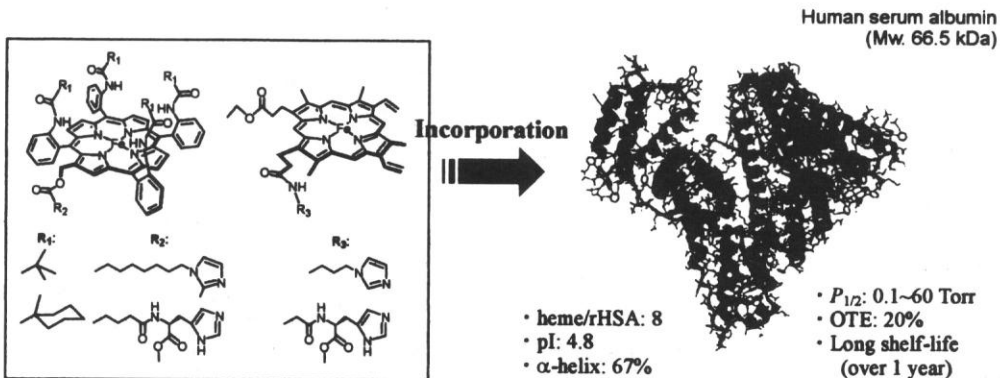


Figure 1 Synthetic hemes and simulated structure of rHSA-heme hybrid

に匹敵する。

3. 生体内投与後の血圧変化と微小循環動態

近年、修飾Hbを利用した赤血球代替物が欧米を中心に具体化されてきているが、血管内皮弛緩因子である一酸化窒素の捕捉に伴う血圧亢進の回避が課題となっている⁸⁻¹⁰⁾。rHSA-hemeの一酸化窒素親和性を測定したところ、Hbより9倍高いことが明らかとなった⁴⁾。つまり、rHSA-heme分子が内皮細胞を透過して平滑筋近傍まで到達すると、瞬時に一酸化窒素を結合し、血管収縮を誘発する可能性がある。しかし予想に反し、rHSA-heme溶液を静注したラットでは、血圧上昇は全く観測されなかった (Figure 2)¹¹⁾。rHSA-

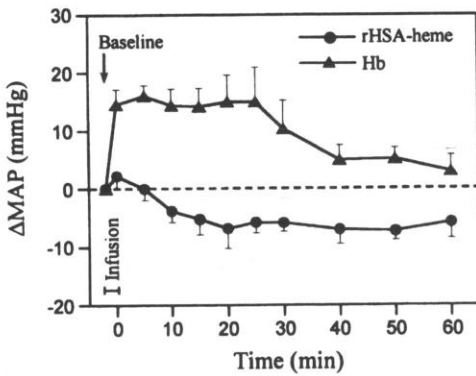


Figure 2 Changes of mean arterial pressure(MAP) after administration of rHSA-heme solution in anesthetized rats.

heme 溶液投与後の腸間膜細動脈径、細静脈径、血流速度にも変化は認められない。この理由はアルブミンの表面電荷があると推察している。アルブミンは Hb に比べ等電点が低く (pI: 4.8)、内皮細胞を取り囲む基底膜との間に負電荷どうしの静電反発を生じるため、その血管内皮透過性はHbの約1/100 と低い。従ってrHSA-hemeの場合、投与後の急激な血圧上昇がないと考えられる。

4. 脱血ショックモデルにおける生体内酸素輸送

麻酔下ラット脱血ショックモデルを作成し、

rHSA-hemeの *in vivo* 酸素運搬能を定量した¹²⁾。まず全血液量の70%をrHSAで希釈後、さらに全血液量の30%を脱血、直ちに同量のrHSA-hemeまたはrHSAを静注し、投与2時間後までの血液ガス、循環系パラメーター、

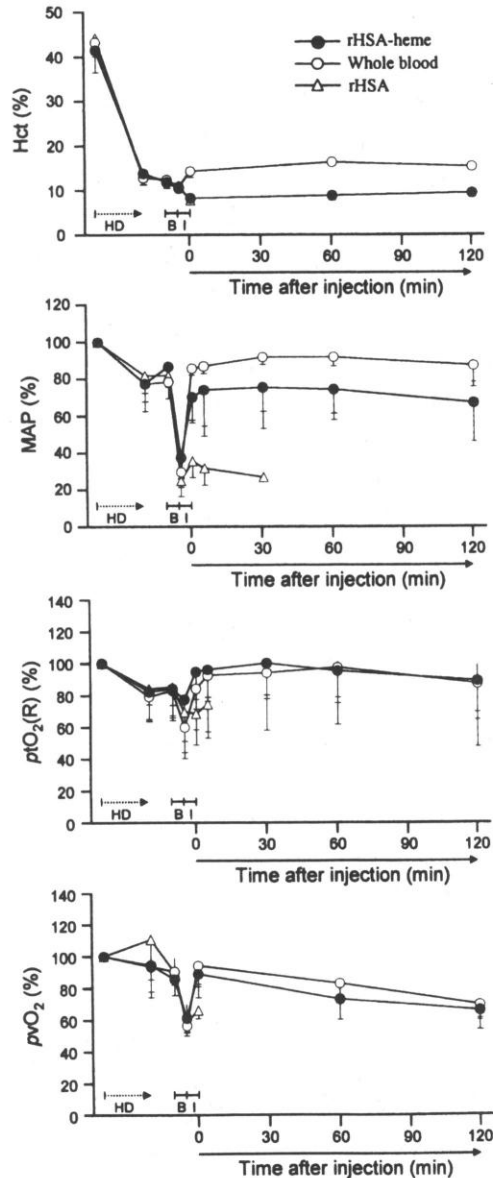


Figure 3 Changes of Hct, mean arterial pressure(MAP), renal cortical O₂-tension(*pt*O₂(R)), venous blood O₂-tension(*pV*O₂) after administration of rHSA-heme solution in anesthetized rats. HD: hemodialysis with rHSA, B:30% bleeding, I: sample infusion.

腎皮質酸素分圧 (PtO_2 (R)) を測定した。平均血圧 (MAP) は30%脱血後には25-38%まで減少、rHSA群ではそのまま回復を認めることなく、投与30分以内に全例が死亡した (Figure 3)。一方、rHSA-heme群では、投与直後に初期値の70% (脱血前値の87%) まで上昇、本製剤が血圧回復に有効であることが明らかとなった。 PtO_2 (R)は30%脱血直後に60-77%まで低下。rHSAのみの投与では回復は見られなかったが、rHSA-heme群では、投与直後に95% (脱血前値の115%) まで上昇し、2hr後でもその値は維持された。

5. アルブミン-ヘム二量体

rHSAのCys-34を1,6-ビスマレイミドヘキサンで選択的に架橋したrHSA二量体を調製し、それに16分子のhemeを包接させたrHSA-heme二量体も合成している¹³⁾。rHSA-heme二量体水溶液は、コロイド浸透圧を生理的条件に保ちながら、ヒト血液を上回る量の酸素を結合できる酸素輸液である。rHSA二量体のMALDI-TOF質量分析スペクトルには、明瞭な分子イオンピーク (m/z 132,741) が観測され、二量体の形成が確認された。rHSAの二次構造、表面電荷は架橋後も変化

せず、rHSA 5.0 wt%溶液のコロイド浸透圧 (19 Torr) と同じ値を有するrHSA二量体溶液の濃度は、8.5 wt%と決定された。さらに、rHSA二量体の血中半減期 (16 hr) はrHSAに比べ2倍に延長することも明らかにしている。

6. まとめ

アルブミン-ヘム製剤は、生体内で安全に酸素を運搬できる完全合成系酸素輸液である。原料を生体物質に依存していないため、感染の心配は全くない。もちろん血液型フリーなので、いつでもどこでも交差試験なしに直ちに体内へ投与することのできる赤血球代替物となる。

現在、我々はさらなるアルブミン新物質群の開発を展開している。アルブミン二量体で得られた基礎知見を拡張し、構造明確なアルブミン多量体を合成。ヘムとの複合化により超高濃度酸素輸送系が具体化できる。また、ヘムをアルブミンに共有結合で強固に固定したヘム結合アルブミンや、遺伝子組換え技術により産生したヘムポケットを持つアルブミンに天然のヘムを結合させたアルブミン-ヘム錯体も創製し、その機能評価を進めている。

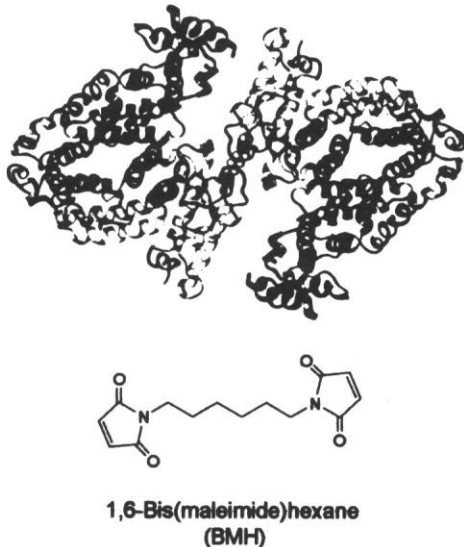


figure 4 Simulated structure of cross-linked rHSA dimer with BMH.

【文 献】

1. T. Komatsu, K. Hamamatsu, J. Wu, et al., *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 82-86.
2. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Mastukawa, et al., *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 797-802.
3. E. Tsuchida, T. Komatsu, K. Hamamatsu, et al., *Bioconjugate Chem.* 2000, 11, 46-50.
4. T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* 2001, 12, 71-75.
5. T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 397-402.
6. A. Nakagawa, T. Komatsu, N. Ohmichi, et al., *Chem. Lett.* 2003, 32, 504-505.
7. Y. Huang, T. Komatsu, A. Nakagawa, et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 2003, 66A, 292-297.

8. T. M. S. Chang. *Art. Cells Blood Subs. Immobil. Biotechnol.* 1997, 25, 1-24.
9. E. Tsuchida E. Perspectives of blood substitutes. In: Tsuchida E, editor. *Blood Substitutes: Present and Future Perspectives.* Lausanne: Elsevier Science; 1998. p 1-14.
10. J. E. Squires, *Science* 2002, 295, 1002-1005.
11. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Matsukawa, et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 2003, 64A, 257-261.
12. T. Komatsu, H. Yamamoto, Y. Huang, et al., *J. Lab. Clin. Med.* 2004, 135, submitted.
13. T. Komatsu, K. Hamamatsu, E. Tsuchida, *Macromolecules* 1999, 32, 8388-8391.