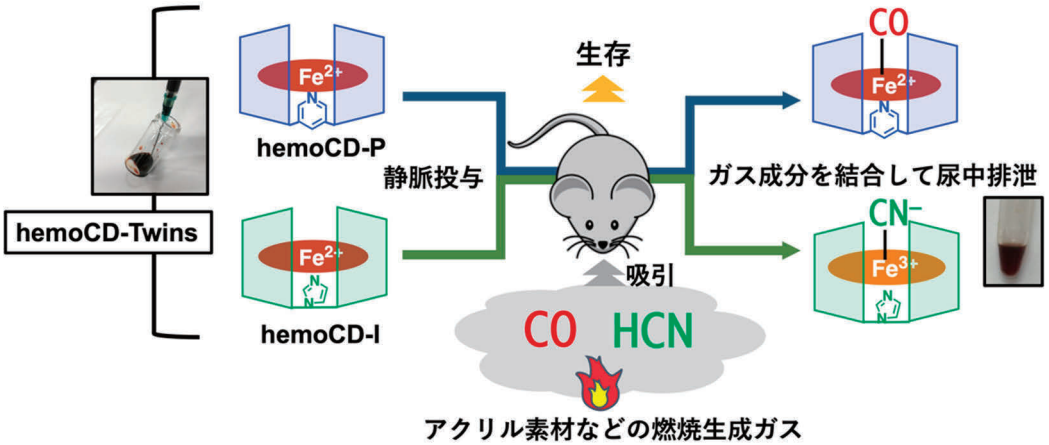
6　火災ガス有毒成分を体外除去する人工ヘモグロビン錯体	北岸　宏亮

【目的】火災において発生する一酸化炭素（CO）は毒性ガスとして有名である。CO 中毒として多くの方が犠牲になっている。一方で建物火災ではアクリル等の燃焼によりシアン化水素（HCN）も発生する。CO 中毒として死因が特定されているにも関わらず、血中 CO 濃度が低いケースもあり、HCN との同時中毒が疑われる。現在までに、CO 中毒をはじめとする火災ガス中毒を治療する方法は開発されていない。そのため現場において医療介入できずに亡くなってしまう犠牲者が後を絶たない。我々はこれまでにポルフィリンとシクロデキストリンの 2 つの化合物を組み合わせて、人工ヘモグロビンモデル錯体 hemoCD を開発し、物性研究などを行ってきた。その際、生体内において CO を特異的に結合する hemoCD-P，HCN を特異的に結合する hemoCD-I という二種類の興味深い化合物を発見した。本研究では、これらを組み合わせた「hemoCD-Twins」というシステムを開発した。この hemoCD-Twins は、投与によって体内から CO と HCN を同時に除去できる薬剤であり、これまで治療薬のなかった火災ガス中毒に対するアンメット・メディカルニーズを満たすものである。本研究では、hemoCD-Twins の設計から薬効試験までを行ったので、その成果を報告する。

【方法】hemoCD-Twins は、合成ポルフィリン錯体（F）と二種類のシクロデキストリン二量体（P および I）の粉末を混合し生理食塩水に溶解させ、還元剤である亜ジチオン酸ナトリウム（S）を加えることで調製した。この溶液をマウスおよびラットに投与することで、薬効試験を行った。

【結果】hemoCD-Twins は予想どおり CO および HCN の両方を結合する性質を示した。CO／HCN 同時中毒マウスを作製し、そこへ hemoCD-Twins を投与すると、濃度依存的に生存率の向上が見られた。さらに CO／HCN 同時中毒ラットを用いて、血中濃度測定などの動態解析を行い、hemoCD-Twins の投与による CO および HCN の同時除去と、それによる血圧のすばやい回復を観測した。投与した hemoCD-Twins は、ガス成分を吸着したまま定量的に尿中排泄され、体内に残存しない薬剤であることが判明した。この薬剤は将来救急救命の現場で使用することを想定してデザインしており、それに最適な物性および薬物動態特性を示した。

火災で発生する CO/HCN の同時解毒システム hemoCD-Twins



6. 火災ガス有毒成分を体外除去する人工ヘモグロビン錯体

北岸　宏亮

同志社大学 理工学部 機能分子・生命化学科

Key words：CO 中毒，シアン中毒，火災，シクロデキストリン，人工ヘモグロビン

緒　言

2019 年 7 月京都アニメーション放火事件、2021 年 12 月大阪北新地ビル放火事件では、それぞれ 36 名および 26 名の犠牲者が治療の手段もなく CO 中毒により亡くなった。消防白書によると、建物火災による犠牲者数は年間約 1,500 名、そのうち約 4 割が火災ガス中毒により死亡している。CO 中毒の国内年間患者数は約 58,000 人にのぼり、死に至らずとも脳症などの後遺症のために社会復帰に支障きたすケースが多い。

火災等によるガス中毒は、日常生活のなかで突発的に発生する。一般的な病気とは異なり、この脅威を減らすためには災害に対する備えが重要である。火災ガス中毒に対する治療法は現在、常圧あるいは高圧酸素換気療法のみである。しかも迅速に酸素喚起療法を行える設備を有する医療施設は数が少ない。上記の北新地ビル火災においても、被災者を運び出す以外に医療行為ができず搬送前に亡くなってしまうケースがほとんどであった。出動した災害派遣医療チーム（DMAT）からは「医療介入する余地がなかった」と無念を訴える姿も大きく報道されている。

火災ガス中毒は、一般的に CO 中毒と認識されるが、建物火災ではウレタンやアクリル素材の燃焼により、HCN ガスも同時に発生する。CO 中毒と報道されても実際には CO と HCN の混合ガス中毒である場合も多い。空気や酸素換気療法では血液中の CO を徐々に追い出すことはできても、HCN を除去することはできない。CO と HCN の両者を同時に解毒する方法は提案されていない。

CO および HCN は、体内に吸入すると赤血球中のヘモグロビン、筋肉中のミオグロビン、細胞内ミトコンドリアのシトクロム類などの生体内ヘムタンパク質に強く結合し、好気呼吸を阻害する。酸素換気は CO 低減には有効だが、HCN 中毒には効果がなく、過剰 O_2による血管損傷や脳機能障害などの後遺症の問題も指摘されている。HCN は CO よりも約 35 倍毒性が高い。HCN 中毒には亜硝酸アミルおよびヒドロキソコバラミンが治療薬として承認されている。亜硝酸アミルはヘモグロビンを鉄（Ⅱ）から鉄（Ⅲ）へと酸化し、鉄（Ⅲ）状態となったメトヘモグロビンがシアン化物イオン（CN^-）を強く結合することで、毒性を緩和する。しかしこの方法はヘモグロビン本来の O_2運搬能を損なうため、酸欠状態となる火災現場では適用不可となる。ヒドロキソコバラミンを火災現場で使用する意見はあるが、実際には CO 中毒への対処が優先されるため実績はない。建物火災では木材や合成繊維が一挙に燃焼し、CO と HCN を含む混合ガスが発生する。CO と HCN は作用機序が似ているため同時中毒では相加的毒性を示す。それにもかかわらず現行の方法では CO 中毒と HCN 中毒の治療方法は併用できず、火災ガス中毒を迅速に効率よく治療する方法は存在しない。

我々はこれまで様々なシクロデキストリン（CD）ダイマー誘導体を合成し、これとポルフィリン鉄錯体を組み合わせた人工ヘモグロビンモデル錯体 hemoCD の合成研究を独創的に行ってきた［1〜3］。人工ヘモグロビンモデル錯体「hemoCD」の知見を活かすことで、CO と HCN を含む火災ガスによる中毒を治療する投与薬剤システムが構築できると考えた。本研究では、CO および HCN を同時にすばやく体外へと排出させる薬剤システム「hemoCD-Twins」を考案し、将来の社会実装を視野に入れた創薬基礎研究を実施した［4］。

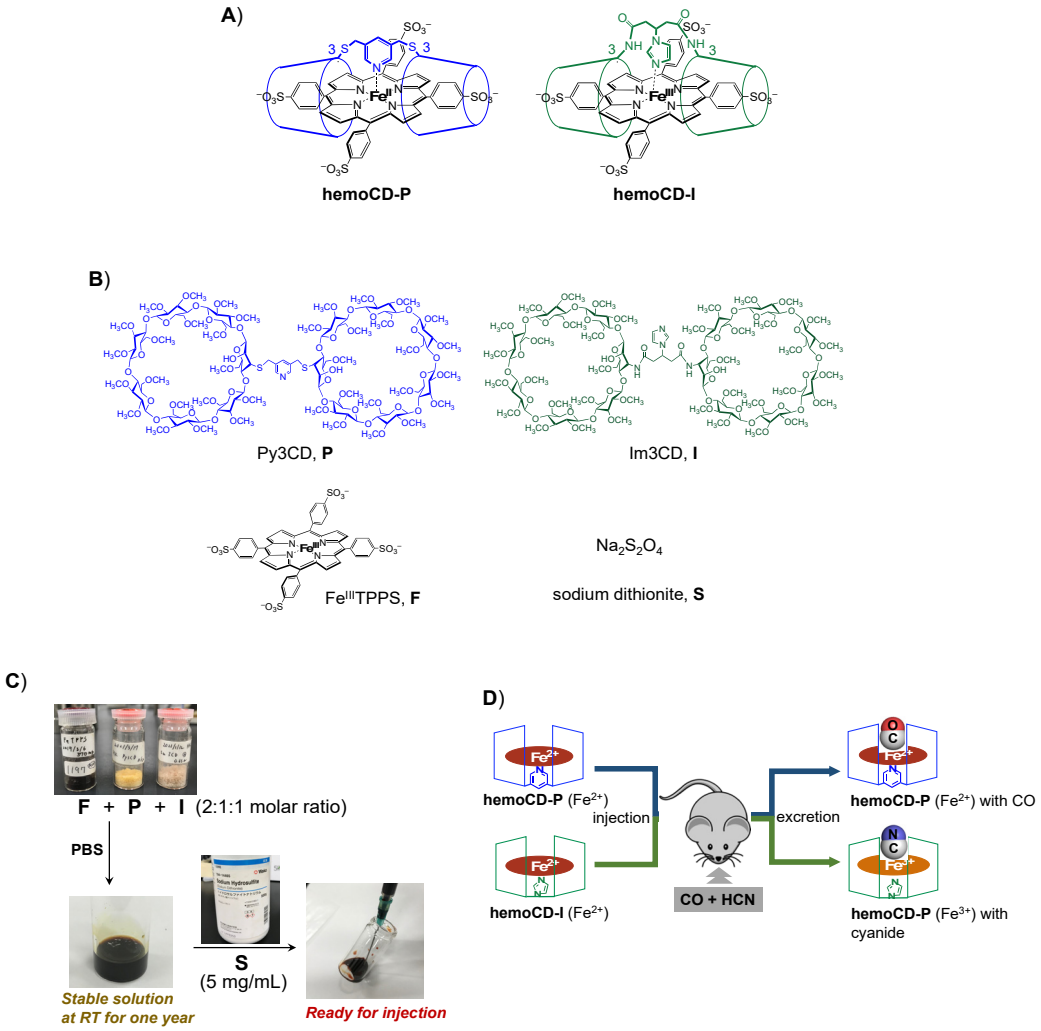


図 1. 本研究にて提案した CO／HCN 同時解毒システム hemoCD-Twins

A) CO および HCN を結合する人工ヘモグロビン hemoCD-P および hemoCD-I。

B) hemoCD-Twins を構成する化合物群。

C) hemoCD-Twins の調製フロー。

D) hemoCD-Twins による CO/HCN 同時解毒スキーム。

方　法

1. 化合物

本研究で使用するポルフィリン鉄錯体（F）、シクロデキストリン二量体（P および I）は、我々の研究室において合成したものを使用した。その他の一般試薬については試薬会社から購入したものをそのまま使用した。

2. 動物実験に関する法令遵守

動物実験については、同志社大学倫理審査室、同志社大学動物実験安全管理委員会、同志社女子大学動物実験委員会、国立研究開発法人建築研究所動物実験委員会にそれぞれ所定の実験計画書を提出し、それぞれの承認を得た上で、実験を実施した。実験を行う際には「動物の愛護および管理に関する法律」「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」などの法令および実験ガイドラインを遵守して遂行した。

3. 薬液調製法

F、P、I をモル比 2：1：1 で混合し、生理食塩水に溶解させて hemoCD-Twins 溶液（還元前）とした。マウスおよびラットへ投与する直前に、S を 5 mg/mL の濃度で加えることで還元体 hemoCD-Twins とした。

結果および考察

1. hemoCD-Twins の酸化還元特性について

hemoCD-P は一旦還元すると還元状態が安定である。一方、hemoCD-I は還元しても酸化が早い。hemoCD-Twins の溶液は、37℃において徐々に酸化され、その速度は二段階であった（図 2A）。それぞれの速度は、hemoCD-P および hemoCD-I の酸化速度に対応する。

hemoCD-P をマウスに腹腔投与すると、尿中から排泄された hemoCD-P の大部分は還元された Fe（Ⅱ）の状態を保っていた（図 2B）。反対に、hemoCD-I を同様に投与して尿を回収すると、主成分は酸化された Fe（Ⅲ）状態であった（図 2C）。両者の混合物 hemoCD-Twins として投与すると、Fe（Ⅱ）／Fe（Ⅲ）の割合は約 1：1 であった（図 2D）。

このような特性は、CO／HCN 同時解毒には適している。なぜなら CO は Fe（Ⅱ）に結合しやすく、シアン化物イオンは Fe（Ⅲ）に高い結合親和性を示すからである。したがって還元状態の hemoCD-Twins を投与すると、hemoCD-P は還元状態のまま CO と結合する一方、hemoCD-I は酸化された状態でシアンを結合可能であることが分かった。

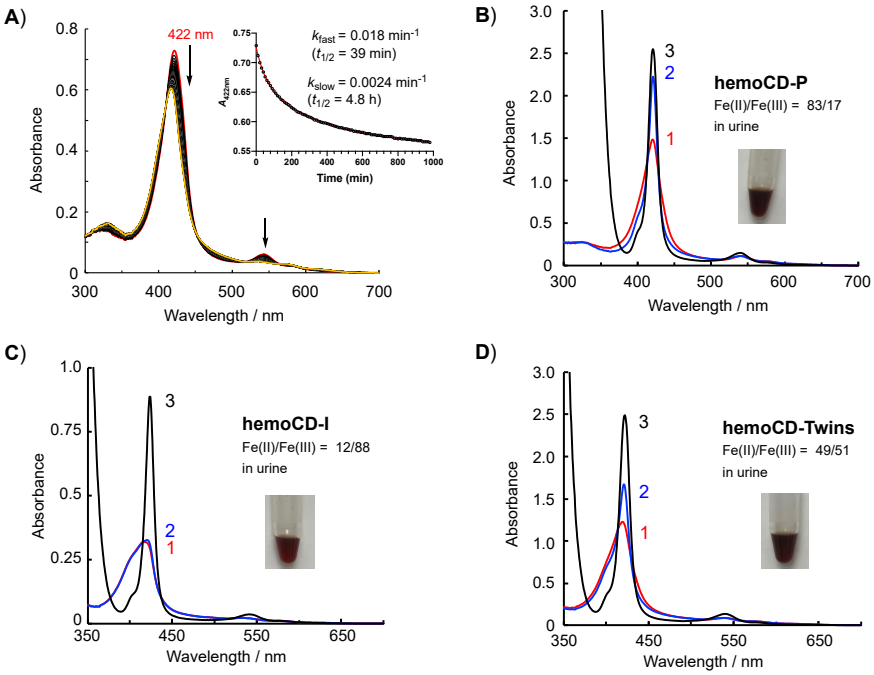


図 2. hemoCD-Twins の物性評価

A） hemoCD-P および hemoCD-I の混合物 hemoCD-Twins は二相系の自動酸化プロファイルを示し、それぞれ異なる速度で自動酸化された。

B～D） hemoCD-P、hemoCD-I、hemoCD-Twins それぞれをマウス腹腔内に投し、得られた尿成分を分析した。3 つのスペクトルはそれぞれ（1）希釈した尿、（2）CO バブリング後、（3）S を加えた後のものを示し、3 つの吸光度より Fe（Ⅱ）の割合を算出した。

2. CO／HCN 同時中毒モデル動物に対する薬効試験

NaCN を経口投与後、CO 雰囲気下のチャンバーに移して CO／HCN 同時中毒モデルマウスとした。この同時中毒マウスでは、CO と HCN はそれぞれ致死量以下であるにもかかわらず、同時投与群において約一時間で全例が死亡した（図 3A）。そこに hemoCD-Twins を投与すると、濃度依存的に生存率が向上し、14 mM、0.2 mL の投与では約 85%のマウスが生存する結果となった（図 3B）。また同時中毒ラットを用いて、血圧をモニタリングしながら中毒症状を観測すると、PBS コントロール群では血圧が下降してまもなく死亡したのに対し、hemoCD-Twins 投与群ではすぐに血圧が回復した。このことから、hemoCD-Twins は CO／HCN 同時中毒に対する解毒作用があり、その効果は迅速であることが判明した。

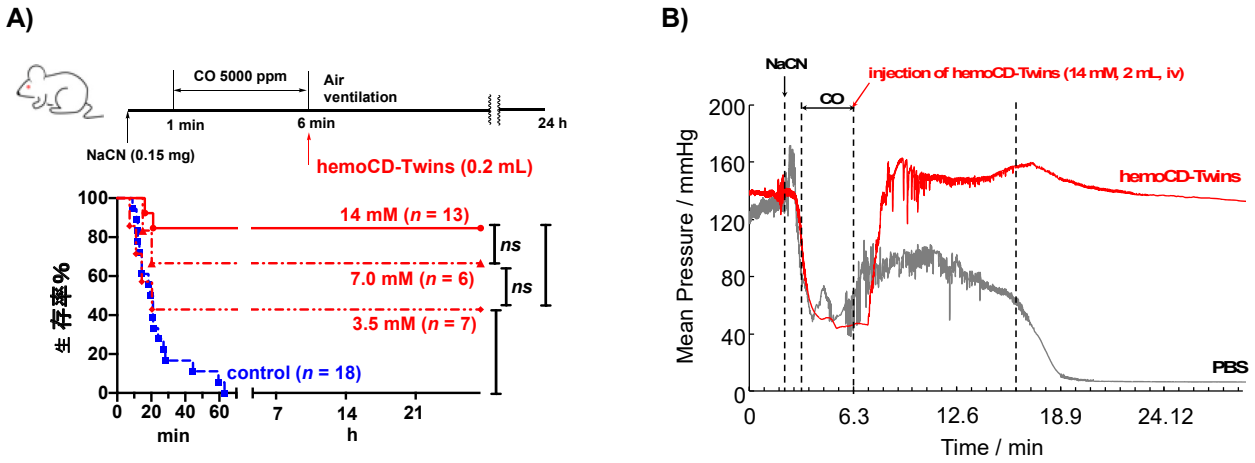


図 3. hemoCD-Twins の薬効試験

A) NaCN と CO を投与した同時中毒モデルマウスに対する hemoCD-Twins の投与効果。生存率で評価した。

B) NaCN と CO を投与した同時中毒ラットに対する hemoCD-Tiwns の投与効果。血圧をモニタリングすることで評価した。

3. hemoCD-Twins の薬物動態および安全性に関する評価

健常ラットを用いて、hemoCD-Twins の薬物動態および安全性に関する評価を行った。血中濃度を測定すると、投与後すぐに上昇して下降するプロファイルが得られた（図 4A）。血中からのクリアランスは主に尿中排泄である。尿中に排泄された hemoCD-Twins を定量すると、約 2 時間後には投与したほぼ 100%の hemoCD-Twins が尿として排泄された（図 4B）。尿中の hemoCD 成分は特に化学構造が変化しておらず、そのまま排泄されていた。組織切片を見ても hemoCD-Twins の組織への沈着は見られなかった（図 4C）。したがって hemoCD-Twins は生体に投与しても有毒ガスを吸着するのみで体内残存せず、定量的に尿中に排泄される極めて安全性が高くメカニズムがクリアな薬剤であることが証明された。

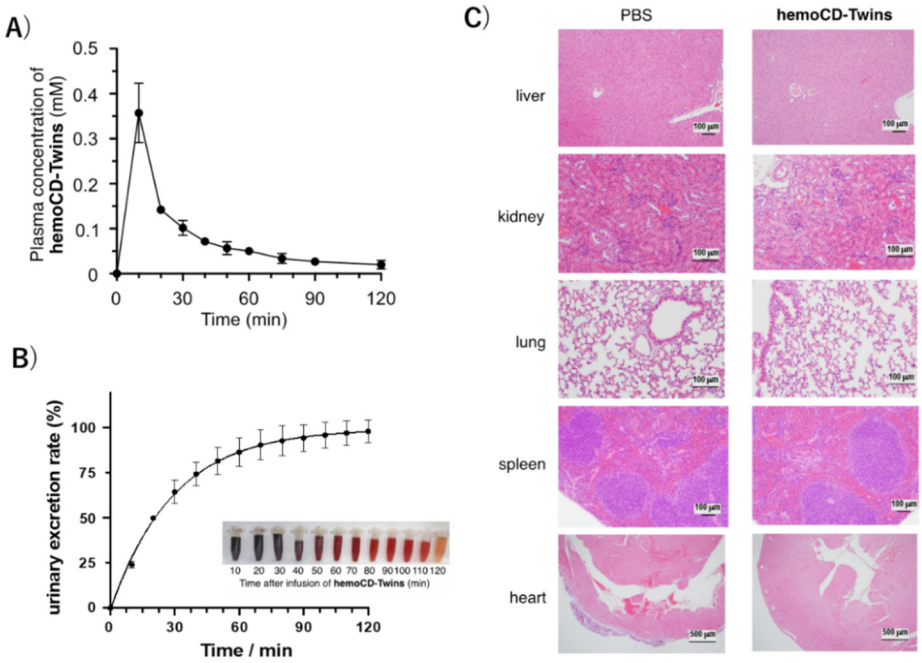


図4. hemoCD-Twinsの薬物動態および安全性試験（健常ラット）

A） hemoCD-Twinsの血中濃度変化。

B） hemoCD-Twinsの尿中排泄プロファイル。

C） hemoCD-Twins投与後の組織切片（HE染色）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、同志社大学理工学部の毛斉悦博士、国立建築研究所の趙玄素博士、同志社女子大学薬学部の喜里山暁子准教授および根木滋准教授、東海大学医学部の川口章特別教授、パリ大学の Roberto Motterlini 博士および Roberta Foresti 博士である。また本研究成果は文献［4］として公表し、一定の成果を挙げることができた。上原記念生命科学財団の研究助成により滞りなく進行することができたおかげであり、ここに改めて感謝の意を表す。

文　献

1） Kitagishi H , Kano K . Synthetic heme protein models that function in aqueous solution. Chem Commun. 2021 Jan 7;57(2):148-173. doi: 10.1039/d0cc07044k. Epub 2020 Dec 21. PMID: 33346275.

2） Mao Q, Kawaguchi AT, Mizobata S, Motterlini R, Foresti R, Kitagishi H. Sensitive quantification of carbon monoxide in vivo reveals a protective role of circulating hemoglobin in CO intoxication. Commun Biol. 2021 Mar 29;4(1):425. doi: 10.1038/s42003-021-01880-1. PMID: 33782534; PMCID: PMC8007703.

3） Mao Q, Kitagishi H. Inclusion Complex Formation with Tetra-PEGylated Tetraphenylporphyrin and Face-to-Face Cyclodextrin Dimer through Unprecedented Molecular Threading. Chemistry. 2023 Mar 1:e202300408. doi: 10.1002/chem.202300408. Epub ahead of print. PMID: 36861298.

4） Mao Q, Zhao X, Kiriyama A, Negi S, Fukuda Y, Yoshioka H, Kawaguchi AT, Motterlini R, Foresti R, Kitagishi H. A synthetic porphyrin as an effective dual antidote against carbon monoxide and cyanide poisoning. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 Feb 28;120(9):e2209924120. doi: 10.1073/pnas.2209924120. Epub 2023 Feb 21. PMID: 36802431; PMCID: PMC9992825.