

特異な生理活性を有するキシラン誘導体の NMR による構造解析

Structural Analysis of Xylan Derivative with Specific Biological Activity by NMR Spectroscopy

瓜 生 敏 之*・吉 田 孝*・中 林 宣 男**・越 川 昭 三***

Toshiyuki URYU, Takashi YOSHIDA, Nobuo NAKABAYASHI and Shozo KOSHIKAWA

1. は じ め に

透析による血液浄化は腎臓病患者の多くに健康および正常人と変わらぬ活動を可能ならしめている。血液中に蓄積する不要な代謝物質を透析によって浄化するダイアライザーには、高分子の膜とくにセルロースやセルロースアセテート膜が使われている。ところが、昭和56年12月から57年3月にかけて、透析患者約170名に眼の発赤・疼痛を主症状とする眼障害(強膜炎, 虹彩炎等)が発生した。その原因は2つのグループによって研究され、セルロースアセテートとウレタン材料が反応して出来たものではないかと最初発表されたが¹⁾, アセチル化ヘミセルロースが主原因と考えられるに至っている²⁾。透析膜の出発原料はセルロースアセテートであり、通常、セルロース源としてコットンリンターが使われるのに、このメーカーの場合だけ木材パルプが用いられた。木材パルプはたとえばサルファイト法で作られる場合約15%のキシラン(D-キシロースのポリマー)等のヘミセルロースを含有していると言われている³⁾。

本研究においては、超電導 NMR 装置を用いて、前記のダイアライザーより抽出された眼障害誘起物質の構造を先ず調べる。次に、眼障害を引起したと同一のセルロースアセテートから中空糸を作り、同様に抽出した物質が眼障害を引起することを確かめた後、超電導 NMR による ¹³CNMR 測定から、その化学構造を調べる。二つの眼障害誘起物質の比較から、構造の同定および生成機構の推定を行う。

2. 実 験

セルローストリアセテート中空糸

アメリカ Eastman Chemical Products, Inc. の CA394-60S を、N-メチルピロリドンとエチレンジグリコール混合液に溶解して紡糸液を調製し、水中へ押し出

* 東京大学生産技術研究所 第4部

** 東京医科歯科大学医工器材研究所

*** 昭和大学藤ヶ丘病院

て紡糸した。

眼障害誘起物質の合成と分離

水酸基が部分的にアセチル化されたキシランおよび/またはセルロースが原因物質と推定されているので、アルカリケン化で部分的脱アセチル化を行った。セルローストリアセテート中空糸またはフレークを0.1N NaOHの20%NaCl水溶液で30°Cにおいて40分加水分解後、精製水で洗浄した。次に、40%エタノールで40°C・2h, 続いて室温18h放置して抽出した抽出液を蒸発乾固させた。乾固した固体にエタノールを加えて70°Cに加温し、不溶物を濾別後、乾燥させた。

炭素-13NMRの測定

ダイアライザーより抽出された強膜炎誘起物質の¹³CNMRは、ジメチルスルホキシド-d₆(DMSO-d₆)中60°Cにて日本電子(株)製GX400スペクトロメーターを用い、100MHzで測定した。セルロースアセテートより合成した強膜炎誘起物質は、DMSO-d₆に溶解後、かなり多くのDMSO-d₆不溶物をガラスフィルターで濾別し、得られたDMSO-d₆溶液につき、60°Cで日本電子(株)GX270スペクトロメーターを用い67.8MHzで測定した。

生理活性の測定

アセチル化多糖(グリカンアセテート)が強膜炎を引起すかどうかは、前報¹⁾と同様に家兎を用いて調べた。アセチル化多糖を生理食塩水に溶解し濃度調節をした試料溶液を作り、これを家兎に一定量静脈内投与した。家兎の眼球結膜の充血度を肉眼的経時的に観察した。

3. 結 果 と 考 察

ダイアライザーからの抽出物で眼障害を起こす物質は、アセチル化したヘミセルロースが主原因と考えられ²⁾、その構造は赤外スペクトル、¹HNMRスペクトル、および糖分析で推定されている。今回、われわれは複雑なポリマーの構造解析に有効な手段である超電導¹³CNMRスペクトル測定を、ダイアライザーからの抽出物²⁾について行った。100MHz¹³CNMRスペクトルを

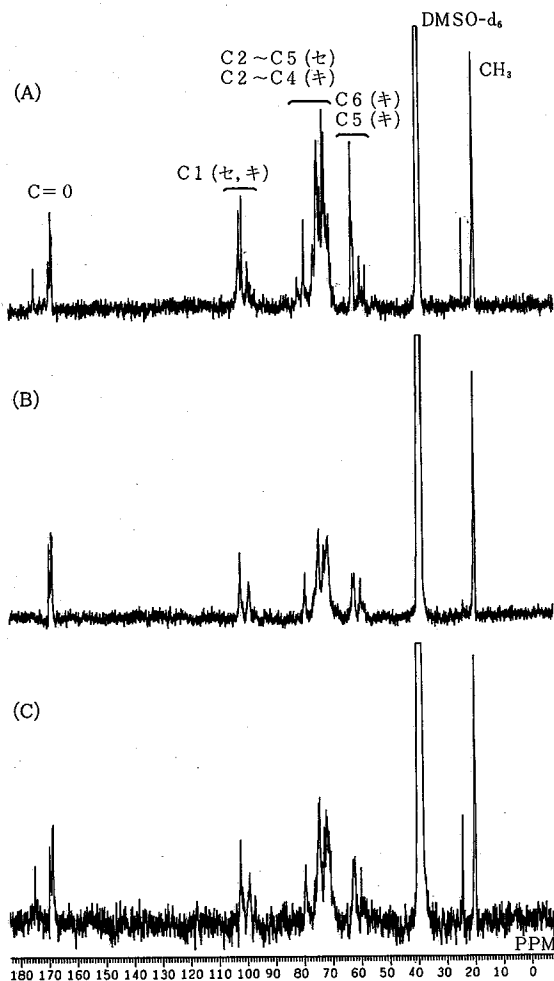
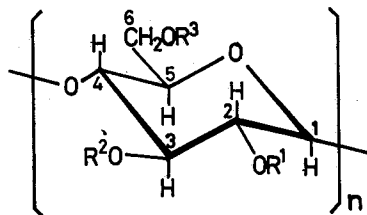


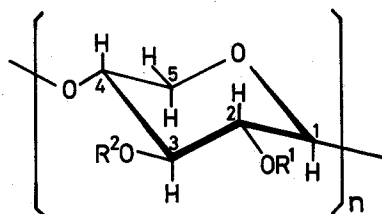
図1 眼障害を誘起する部分アセチル化ポリサッカライドの¹³C-NMR スペクトル。(A)ダイアライザーからの抽出物(100 MHz ¹³C), および(B)セルロースアセテート(含キシランアセテート)中空糸からの合成物(67.8 MHz ¹³C), および(C)セルロースアセテート(含キシランアセテート)フレックからの合成物(67.8 MHz ¹³C)

図1 (A)に示す。

溶液濃度が低かったためノイズの多いスペクトルであるが、典型的なポリサッカライド誘導体のスペクトルであることがわかる。58~103 ppm に現れている3つの領域の吸収は、グルコースのポリマー(グルカン)⁴⁾やキシロースのポリマー(キシラン)⁵⁾に見られる多糖骨格の炭素吸収である。ことに、98~103 ppmに見られる吸収が、アセタール炭素C1に基づくものであることはよく知られている。他の化学構造に基づく典型的な吸収として、20ppmのCH₃と、168~170 ppmのC=Oに基づくピー



セルロース誘導体



キシラン誘導体

(R¹, R², R³はHまたはCOCH₃)

表1. 眼障害誘起物質の多糖誘導体の¹³C-NMR 解析

炭素	ケミカルシフト ppm	吸収強度比	
		ダイアライザ- ザ-グリ カンアセテ- ート ^{a)}	合成したグリ カンアセテ- ート ^{b)}
CH ₃	19~25	0.69	1.14
C 5 (キ), C 6 (セ)	58~64	1.17	1.07
C 2~C 4 (キ)	{ 69~77	3.31	3.75
C 2~C 5 (セ)	{ 79~81		
C 1 (キ, セ)	{ 98~100	1.0	1.0
	{ 102~103		
C = O	168~170	0.64	0.72

キ, キシラン骨格. セ, セルロース骨格.

a) 100MHz¹³C-NMRで測定. b) 67.8MHz¹³C-NMRで測定

クがある。これはアセチル基CH₃C=Oによって水酸基OHが置換されていることを示している。58~64 ppmと69~81 ppmに沢山のピークが現れているが、これは糖骨格のC2~C5の4炭素またはC2~C6の5炭素に基づく。58~64 ppmの吸収は、残る69~81 ppmの吸収より高磁場に現れていることと、吸収強度からキシラン骨格およびセルロース骨格におけるメチレンCH₂の炭素によると帰属してよい。このようにして求めた各炭素の帰属を表1に示す。

研 究 速 報

糖分析により多糖誘導体はキシロースとグルコースを糖成分とすることが見出された²⁾。表 1 に C1 炭素の吸収強度を 1 としたときの各炭素の吸収強度比を示している。ダイアライザーのグリカン(多糖)アセテートについてみると、 CH_3 0.69 と $\text{C}=\text{O}$ 0.64 から、アセチル基の割合は平均をとって 0.67 となる。あまり正確ではないが、糖残基 3 つのうち 2 つは水酸基が 1 個アセチル基に置換されている。出発原料はセルローストリアセテートであるので、セルロースの 3 個の水酸基がアセチル化されており、同時に含まれているキシランアセテートも 2 個のアセチル基をもつはずである。工業的にダイアライザー用の中空糸を作る際、セルロースアセテートの中空糸を作製後、脱アセチル化の操作がなされている。キシランもセルロースももちろん水溶性ではないが、このような脱アセチル化で部分的にアセチル基が残った部分アセチル化グリカンは、水溶性になるものと考えられる。アセチル基の位置はキシランでは 2 位と 3 位、セルロースでは 2 位と 3 位—セルロースの 6 位は水酸基の可能性が大きい—のいずれかであるが、NMR だけでは結論できない。C2~C4(キ)および C2~C5(セ)に基づく吸収が沢山のピークとして現れていることは、アセチル基の位置が一定でなく構造が多様であることによる。

キシランは C2~C4 の 3 炭素、セルロースは C2~C5 の 4 炭素が 69~77 と 79~81 ppm に分かれて現れるが、実測の吸収強度比 3.31 からグリカンにはキシランとセルロースが共に含まれていることを示している。吸収強度比 3.31 から計算すると、キシラン：セルロース = 2.2 : 1 になる。このサンプルについて糖分析ではキシロース：グルコース = 1.6 : 1 と求められており²⁾、両者はかなり近い値と言える。どちらかと言えば、NMR のほうがスペクトルがよくないので不正確であろう。

眼障害誘起物質が多糖誘導体であることが分かったので、次にこれを合成によって確認しようと試みた。市販のダイアライザーに使用されたと同じセルローストリアセテートを入手し、工業的製法と同じ方法を用いて、N-メチルピロリドンとエチレングリコール混合液に溶解させたセルローストリアセテート溶液を作って紡糸液とした。紡糸液を孔径 0.8 mm のノズルから水中に押し出して中空糸を作った。中空糸を 0.1 N NaOH の 20% NaCl 水溶液でケン化することにより部分的にアセチル基を水酸基に変えた。40% エタノールに可溶の部分抽出して、乾燥後赤外スペクトルを測定し、ダイアライザーからの抽出物のそれとほぼ同一であることを確かめた。

セルロースアセテート中空糸より抽出した多糖誘導体が眼障害を誘起することは、家兎にその生理食塩水溶液を注射することにより確かめた。後述する NMR 測定用

サンプルを調製する際に分かったことだが、中空糸よりの抽出物はかなり高い割合のジメチルスルホキシド不溶物を含有していた。この物質は加水分解の際に添加した塩化ナトリウムと思われるので、現在同定を行っている。抽出物の誘起する眼障害については別に発表する。このようにして得られたセルロースアセテート中空糸抽出物は、ダイアライザーからの多糖誘導体と同程度の眼障害誘起性を有していた。

セルロースアセテート中空糸からの抽出物の 67.8 MHz ^{13}C NMR スペクトルは、図 1 (B) に示す。試料は 40% エタノールで抽出し乾燥後 95% エタノール不溶の物質で、水溶性であった。NMR 測定溶媒はジメチルスルホキシド- d_6 (DMSO- d_6) を使用しており、不溶物は濾過して除いてある。高磁場側から約 20 ppm に CH_3 、58~64 ppm にキシランの C5 およびセルロースの C6 の CH_2 、69~81 ppm にキシランの C2~C4 およびセルロースの C2~C5 の CH、98~103 ppm に C1、および 168~170 ppm に $\text{C}=\text{O}$ のそれぞれ炭素吸収が見られる。試料濃度が高かったためか、スペクトルは合成物のほうがダイアライザーからの抽出物よりはっきりと現れている。

各吸収の強度は、C1 炭素のそれを 1 として求め、表 1 に示す。 CH_3 の相対強度 1.14 と $\text{C}=\text{O}$ のそれ 0.72 は CH_3 $\text{C}=\text{O}$ によるはずであるから本来一致すべき値であるが、NOE によって差が生じたと思われる。少しずつ合成条件の異なるサンプルについて測定した結果も、同様に CH_3 が $\text{C}=\text{O}$ より大きく現れた。2 つの値を平均すると 0.93 となるが、C1 に対してつまり 1 つの糖残基当り 0.93 のアセチル基がついている。このアセチル基の割合は、ダイアライザーからのグリカンアセテートのそれ 0.67 に比べてやや高い。しかし、合成したグリカンアセテートが眼障害を引起したことを考えると、多糖中に置換して含まれているアセチル基の数はある巾を持っているのだろう。

C2~C4 のキシランによる吸収と C2~C5 のセルロースによる吸収の強度は、合成物では 3.75 であった。これに基づいてキシランとセルロースの割合を計算すると、キシラン：セルロース = 1 : 3 と求まった。

図 1 のスペクトル(A)と(B)を詳細に比較すると、たとえば C1 炭素の吸収において、98~100 と 102~103 ppm の 2 つのピークの相対強度に両者で明らかな差が見られる。58~61 と 62~64 ppm の 2 本のピークについても同様である。つまり、それぞれ高磁場側のピークの相対強度は、合成物のほうがダイアライザーからのグリカンアセテートよりも強い。C1 炭素の吸収が 2 本のピークとして現れている理由として、(1) キシランとセルロース

とで別々のケミカルシフトをもつ、および(2)糖残基中のアセチル基の置換度と置換位置の相違によってC1炭素が分かれたのいずれかと考えられる。いずれの理由によるかは今のところ分からない。

ダイアライザーからのグリカンアセテートがどのように生成したかを探るため、本実験では中空糸を作製し、なるべく忠実に再現した。最後に、セルロースアセテートのフレークを用い、部分脱アセチル化によっていかなる構造の部分アセチル化ポリサッカライドが得られるかを予備的に調べた。フレークから得られた多糖誘導体の67.8 MHz ^{13}C NMR スペクトルを図1(C)に示す。図1(C)は(A)および(B)とほとんど同じ構造の部分アセチル化ポリサッカライドが得られていることを示している。ただ、(C)では各炭素吸収の近くに、他の2つのスペクトルにないか、あっても小さいピークが、はっきりと現れている。24.5, 59.0, 97.5 および 175.0 ppm 付近のピークがそれである。

部分アセチル化キシランあるいは部分アセチル化セルロースが眼障害の原因物質と分かって来たが、このような物質が生体に有毒であるとは全く考えられていなかった。キシラン骨格かセルロース骨格が主原因であるのかまたはそのいずれもが原因物質であるのかは、現在全く

分からない。木材中のキシラン等のヘミセルロースは本来セルロースとは共重合体を形成していないと考えられている。キシランだけを木材パルプより抽出し、本実験で行ったと同様の誘導によって眼障害を引き起す物質が合成できれば、より明確な原因物質の同定が出来ると期待される。

謝 辞

セルロースアセテート中空糸の作製に協力いただいた繊維高分子材料研究所の山本正秀博士に感謝致します。

(1985年5月9日受理)

参 考 文 献

- 1) 越川昭三, 小暮美津子, 前川正信, 三村信英, 中林宣男, 太田和夫, 人工臓器 12(5), 943(1983).
- 2) 大場琢磨, 辻楠雄, 中村晃志, 新谷英晴, 水町彰吾, 菊池寛, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 叶多謙蔵, 川崎靖, 隆矢強, 松本清司, 戸部満寿夫, 人工臓器 13(2), 792(1984).
- 3) 松崎啓, 守屋正夫, 秋月和雄, 祖父江寛, 工化誌, 62, 1030(1959).
- 4) T. Uryu, C. Yamaguchi, K. Morikawa, K. Terui, T. Kanai, K. Matsuzaki, *Macromolecules*, 18, 559(1985).
- 5) T. Uryu, J. Yamanouchi, S. Hayashi, H. Tamaki, K. Matsuzaki, *Macromolecules*, 16, 320(1983).

