

- lial system. *Am J Pathol* 2001; 159: 1079-1088.
- 8) 厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業 臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究(総括研究報告書)(研究代表者:土田英俊)(H12-医薬-009). 平成12年度~14年度.
- 9) Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, *et al* : Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 1999; 277: G1088-G1096.
- 10) Kyokane T, Norimizu S, Taniai H, *et al* : Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 2001; 120: 1227-1240.
- 11) Takeoka S, Teramura Y, Atoji T, *et al* : Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation. *Bioconj Chem* 2002; 13: 1302-1308.
- 12) 武岡真司, 岡村陽介, 土田英俊, 池田康夫: 血小板代替物の担体設計から Drug Local Delivery の可能性. 日本血栓止血会誌 2004; 15: 21-26.
-



周術期輸液の最前線

編集 宮尾秀樹

埼玉医科大学総合医療センター
麻酔科教授

真興交易株式会社医書出版部

酸素輸液の展望

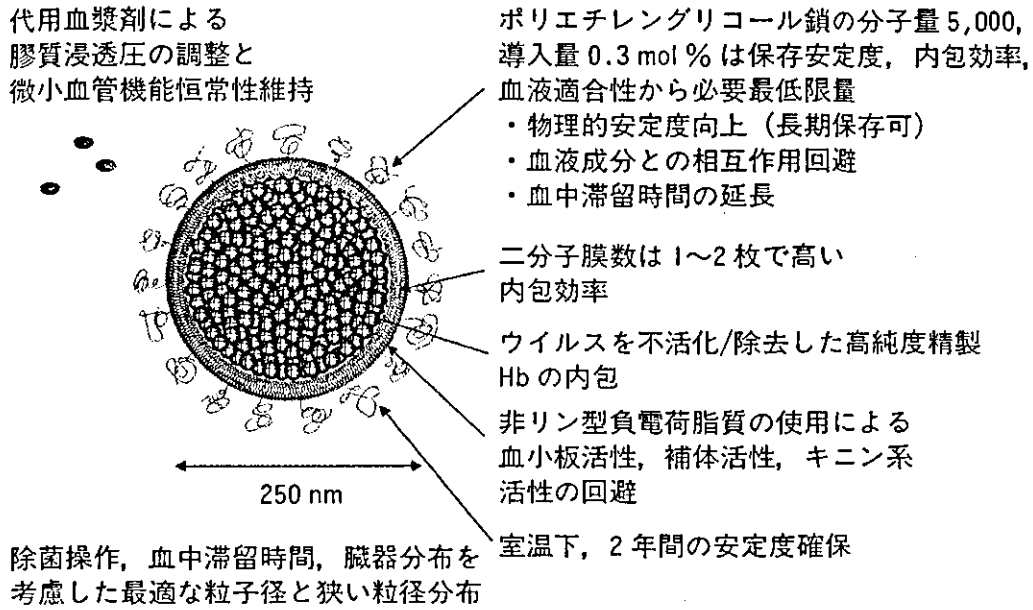
1) 小胞体型人工赤血球の開発動向

① 人工赤血球の必要性

事故や手術時に大量の血液が消失した場合には、輸液の補充によって循環血液量を維持するか、輸血によって酸素も補充する措置がその出血量や状況に応じて選択される。しかし、献血血液による同種血輸血では感染のリスクが否定できず、自己血輸血では利用できる状況が制限されている。したがって、酸素輸液（人工赤血球）の開発は必要であり、最新の科学技術の進歩と共にその製剤化技術、有効性や安全性の評価技術および医療上の適応などに関する研究が加速的に進展している。人工赤血球は、①血液型を選ばずに輸血ができ、②HIV、肝炎やその他未知のウイルスなどによる感染症の心配がなく、③備蓄が可能であるため即時に大量供給が可能である。さらに④品質が保証された安全な製剤供給の観点から、現行の輸血用血液製剤を補完し、21世紀医療の進歩に大きな影響を与え得るものと期待されている。

② 人工赤血球の開発の現状

酸素輸液としては、パーフルオロカーボン乳剤や修飾ヘモグロビン (Hb) などさまざまな種類が検討されてきたが、赤血球と類似の構造をもつ高濃度



図① Hb 小胞体の特徴.

Hb をリン脂質二分子膜で包み込んだ Hb 小胞体 (図①) が, 最も安全度の高い製剤として開発が進められている^{1,2)}. 現段階では期限の切れた献血血液由来の Hb の有効利用が進められているが, 将来的には Hb は遺伝子組換え体を利用されるであろう. Hb 精製時に血液型を決める型物質や Hb 以外のタンパク質, ウイルス (もし含まれたとしても) が除去され, 安定なリン脂質膜で包み直すため室温で 2 年間の保存が可能であり, 人工物の大きな長所となっている.

③ ヘモグロビン小胞体の性状と評価

Hb 小胞体の製造については, 膜構成脂質と Hb 分子の精密な集合制御技術と膜処理やガス交換技術の組合せによって, 現実的な量産体制が構築されつつある. 製剤の物性規格を表①にまとめた. 赤血球と同様, 膠質浸透圧はほとんどゼロである. 膠質浸透圧の調節が必要な場合にはアルブミン製剤

表① Hb 小胞体の規格

項目	規格値
粒径 (nm)	240~280
P ₅₀ (torr)	27~34
[Hb] (g/dl)	10.0±0.4 (8.6±0.4 ^{a)})
[総脂質] (g/dl)	4.6~5.4 (5.3~5.9 ^{a)})
[Hb]/[総脂質] (g/g)	1.6~2.1
[PEG-脂質] (mol %)	0.3
metHb (%)	<3
HbCO (%)	<2
粘度 (cP at 230 s ⁻¹)	2~3 (3~4 ^{a)})
晶質浸透圧 (mOsm)	300
膠質浸透圧 (Torr)	0 (20 ^{a)})
pH (37°C)	7.4
エンドトキシン (EU/ml)	<0.1
無菌試験	検出なし

^{a)}: 20% アルブミン製剤と混合後.

(将来的には遺伝子組換えヒト血清アルブミン) などの代用血漿剤を併用する。粒径は 250 nm と赤血球の約 1/30 であるので、虚血部位の酸素化など赤血球にはない機能が期待できる。通常の遠心分離 (4,000 g, 6 min) では赤血球は沈殿するが、Hb 小胞体は沈殿しない。赤血球と分離できる利点の反面、血液分析に影響を及ぼすので高分子の添加や超遠心分離操作 (50,000 g, 20 min) で沈殿させる³⁾。また、酸素親和度はアロステリック因子、ピリドキサル 5'-リン酸の共封入により赤血球と同様の値に調節されている。脂質類の成分組成には特別な工夫が施されており、常温で 2 年間液状保存を可能とし⁴⁾、血流中での溶血の回避と適当な血中滞留時間、補体・血小板・白血球への影響がほとんどない⁵⁾ など、従来のリポソーム製剤で指摘さ

れてきた課題が解決されている。当然のことながら、ウイルスの不活化と除去が製造工程に組込まれ、無菌試験、エンドトキシンやパイロジェンなどの試験にも合格した製剤となっている。

高折⁶⁾はHb小胞体の安全性と有効性を検討するための動物試験項目を細かく提示しており、それに従った試験が厚生労働科学研究で進められている。現在までに得られている評価試験の概要を示す。主にラットやハムスターを用いた試験であるが、基本的な安全性と酸素輸送効果は十分確認できている。また、現在霊長類を用いた安全性試験が進行している。

ラット 25% ^{99m}Tc 標識 Hb 小胞体負荷試験では、血中半減期は 35 時間程度であった。Hb 小胞体は主として肝臓のクッパー細胞と脾臓のマクロファージに捕捉され、老廃赤血球などの代謝と同様の経路をたどるものと考えられる。ラット 20 ml/kg 負荷投与試験により細網内皮系での代謝過程、血液生化学検査を実施したところ、肝臓と脾臓の重量は一過性に増大し、貪食細胞に取り込まれた Hb 小胞体は 1 週間後にはほとんど消失した。また、血液生化学検査を詳細に行ったが、リパーゼやコレステロール値の一過性の有意な亢進以外の変動は認められなかった⁷⁾。ラット 40% 血液交換・長期生存試験では、ヘマトクリット値は 7 日後に前値に復し⁸⁾、ラット (10 ml/kg/day) で 14 日間の反復投与ならびにその後の 14 日間生存試験では、全例 (14 例) 生存し体重も増加し続けた。生化学検査では脂質成分とリパーゼの亢進以外には変動を認めず、14 日後には正常値に戻った⁹⁾ ことから、きわめて安全度の高い製剤であることが明らかとなった。活性酸素によって Hb はフェリル体やメト体となって酸素結合能を失い鉄イオンが遊離するが、Hb 小胞体はこれらを閉じ込めたまま、赤血球と同様に主として脾臓で代謝されるため安全性が高いものと考察される¹⁰⁾。肝臓の微小循環動態観察では、Hb をそのまま投与すると内因性 CO の消去による類洞血管の収縮、ビリルビンの過剰生成と胆汁分泌機能の低下が認められたが、Hb 小胞体ではそのような作用は観測されなかった^{11,12)}。しかし、類洞内のクッパー細胞

が Hb 小胞体を捕捉すると肥大して一過性に類洞血管の狭小化をきたす、また、貪食細胞の機能飽和による生体防御機構の低下が懸念されるため、適正投与量が存在することが示唆された。

酸素運搬効果をみる動物実験の結果を以下に紹介する。ラット 40% 脱血ショック・同量投与による回復試験では、生理食塩液、メトヘモグロビン小胞体分散液と比較して有意な酸素運搬効果を確認し、これは同 Hb 濃度の赤血球分散液と同等であった¹³⁾。また、ラット全血液量の 90% を Hb 小胞体のアルブミン分散液で交換した場合には、血行動態、血液ガスパラメータ、組織酸素分圧ともに維持され、アルブミン溶液で交換した場合と比較して顕著な有効性を示した¹⁴⁾。ハムスターの血液量の 80% を Hb 小胞体のアルブミン分散液で交換して皮下微小循環動態を非侵襲に観測したところ、組織酸素分圧は脱血前の 60~70% まで低下したものの、対照アルブミン投与群での 5 倍以上の値が維持されていた¹⁵⁾。また、修飾 Hb に認められる抵抗血管の収縮と血圧亢進の現象は全く認めなかった¹⁶⁾。現在、試料の安全性とともに有効性も証明し得る動物モデルとして、ビーグル犬の脾摘後 50% の脱血によりショックを作成し、1 時間経過した後に蘇生液として Hb 小胞体のアルブミン分散液を投与するモデルを検討している。

④ 人工赤血球の適用と展望

Hb 小胞体は現在、実施企業で GLP (good laboratory practice) による非臨床試験、GMP (good manufacturing practice) 製造体制の準備が進められている¹⁷⁾。また、本邦に適した臨床試験のためのプロトコールの検討も過去の人工酸素運搬体の臨床例や課題を参考に進められている¹⁸⁾。当面、希釈式自己血輸血、希少血液型患者での一般輸血の代替、あるいは予測せざる手術時出血への代用血漿剤と併用した単回での投与などを目標としており、救急用途への拡大が考えられている。その際には、現行の赤血球濃厚液の使

用がガイドライン¹⁸⁾に即した人工赤血球の使用ガイドラインが必要となるであろう。さらには腫瘍の酸素化による放射線治療効果の促進、赤血球が通過できない狭窄部も通過できるサイズをもつ酸素運搬体による組織の酸素化、人工心肺を用いた体外循環回路の充填液としての輸血の代替、人工呼吸器でも改善しない重い肺障害に適用する液体換気用の酸素富化膜などの適応が検討されている。また、パルスオキシメータなどのモニターや血液生化学検査では項目によっては影響がでると推測されるため、装置やプログラムの改良も必要であろう。安全で有効な小胞体型人工赤血球が臨床現場で使用され、救命に役立つ日が1日も早くくることを願う次第である。

文 献

- 1) 土田英俊, 酒井宏水, 武岡真司, 他 : 酸素輸液 (人工赤血球). 医学のあゆみ 2003 ; 205 : 558-66
- 2) Tsuchida E : Blood Substitutes -Present and Future Perspectives. Amsterdam, Elsevier, 1998
- 3) Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, et al : Pretreatment of serum containing hemoglobin vesicles (oxygen carriers) to prevent their interference in laboratory tests. Clin Chem Labor Med 2003 ; 41 : 222-31
- 4) Sou K, Endo T, Takeoka S, et al : Poly (ethylene glycol) -modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly (ethylene glycol) -lipid into the vesicles. Bioconjugate Chem 2000 ; 11 : 372-9
- 5) 阿部英樹, 藤原満博, 東 寛, 他 : リポソームと補体系との相互作用. 人工血液 2003 ; 11 : 151-9
- 6) 高折益彦 : 人工血液としての条件. 人工血液 2002 ; 10 : 28-35
- 7) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, et al : Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers-Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. Am J Pathol 2001 ; 159 : 1079-88
- 8) 研究代表者 土田英俊 : 厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業「臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究」(H 12-医薬-009) 平成 12 年度~14 年度 総括研究報告書
- 9) Sakai H, Yamamoto M, Masada Y, et al : Exchange-transfusion with Hb-vesicles suspended in recombinant human

- serum albumin: hemodynamics, blood gas parameters, serum biochemistry and hematopoietic activity in rats for 2 weeks. *Transfusion Med* 2003 (in press)
- 10) Takeoka S, Teramura Y, Atoji T, et al: Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation. *Bioconjugate Chem* 2002 ; 13 : 1302-8
 - 11) Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, et al: Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 1999 ; 277 : G 1088-96
 - 12) Kyokane T, Norimizu S, Taniai H, et al: Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 2001 ; 120 : 1227-40
 - 13) Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, et al: Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit Care Med* 2003 ; 32 : 539-45
 - 14) Sakai H, Takeoka S, Park SI, et al: Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* 1997 ; 8 : 23-30
 - 15) Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, et al: Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol* 2002 ; 283 : H 1191-9
 - 16) Sakai H, Hara H, Yuasa M, et al: Molecular dimensions of Hb-based O-2 carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol* 2000 ; 279 : H 908-15
 - 17) 高折益彦: 人工血液 (HbV) 安全性, 有効性に関する治験計画. *人工血液* 2002 ; 10 : 99-106
 - 18) 血液製剤調査機構編: 赤血球濃厚液の適正使用について. 血液製剤の使用にあたって 1999 ; 5-11

(武岡真司)

別刷 50部

講座

人工赤血球・人工血小板の開発の現状

武岡真司
早稲田大学理工学術院

はじめに

筆者の所属する研究グループ（早稲田大学理工学総合研究センター）は、慶應義塾大学医学部と共同して厚生労働省科学研究、医薬品・医療機器などレギュラトリーサイエンス総合研究事業、H16-医薬-067, 069, 071¹⁾に、人工赤血球と人工血小板の研究を推進している。人工血液全体の現状に関しては、厚生労働省科学研究の研究代表者小林紘一教授による本誌「講座」に詳しい²⁾。本「講座」では、これらの厚生労働省科学研究の研究成果の一部も含めて報告する。人工赤血球は、リン脂質の二分子膜小胞体（リポソーム）に酸素を酸素分圧に応じて吸収・脱着する分子（ヘモグロビン）を内包させた酸素運搬体であり、これが血中に長く留まって安全、安定に酸素運搬機能を発現し続ける。それに対して人工血小板は、血管損傷部位や活性化した血小板のみを認識する分子をリポソームやアルブミン重合体に担持した微粒子であり、これが血中に長く留まって血管損傷部位に特異的に粘着して止血機能を発現する。筆者らは理工学の立場から人工赤血球や血小板の材料となる担体の設計、製造、物性評価を行ってきた。担体には、適当な血液適合性や血中滞留性が求め

られるが、分解性や代謝物の低毒性も重要な検討項目である。現在担体としてリン脂質分子の集合体（リポソーム）や遺伝子組み換えヒトタンパク質の複合体や重合体を選択している。用いて

1. ヘモグロビン小胞体の構造

人工赤血球としてパーフルオロカーボン乳剤や修飾ヘモグロビンなどが検討され臨床使用されてきたが、機能や安全性の観点から満足できるものではなかった。筆者の所属するグループで開発を進めている、高濃度ヘモグロビンをリポソームの内水相に内包させた、赤血球と類似構造のヘモグロビン小胞体(図①)は、最も安全度と機能が高いため早期の臨床試験着手が期待されている²⁾。現段階では期限の切れた献血血液由来のヘモグロビンの有効利用が進められているが、将来的には遺伝子組換えヒトヘモグロビンが利用されるであろう。赤血球からヘモグロビンを精製する際に、血液型を決める型物質やヘモグロビン以外のタンパク質、ウイルスや菌（もし含まれたとしても）を加熱やフィルター処理で除去されている。生理活性なヘモグロビンを安定なリン脂質膜で包むことによって、ヘモグロビンに由来する副作用（血管収縮や腎毒性、神経毒など）を回避できる。ヘモグロビン小胞体は生理食塩液に分散され、脱酸素状態で容器に密封されているため、室温で2年間の液状保存（赤血球製剤では採血後3週間の冷蔵保存）が保証されており、乾燥粉末ではさらに長期間の保存が可能である。製剤のヘモグロビン濃度

キーワード：~~人工赤血球~~、~~人工血小板~~、~~リポソーム~~、~~ヘモグロビン~~、~~酸素運搬体~~、~~血管損傷部位~~、~~止血機能~~、~~血液適合性~~、~~血中滞留性~~

③ 語
大久保
(マ)

Seminar
Current Development of Artificial Red Blood Cells and Artificial Platelets
Shinji Takeoka (Waseda University, Faculty of Science and Engineering)

〒169-8555 東京都新宿区西早稲田1-6-1
早稲田大学理工学術院：助教授

大久保3-4-1

講座 人工赤血球・人工血小板の開発の現状

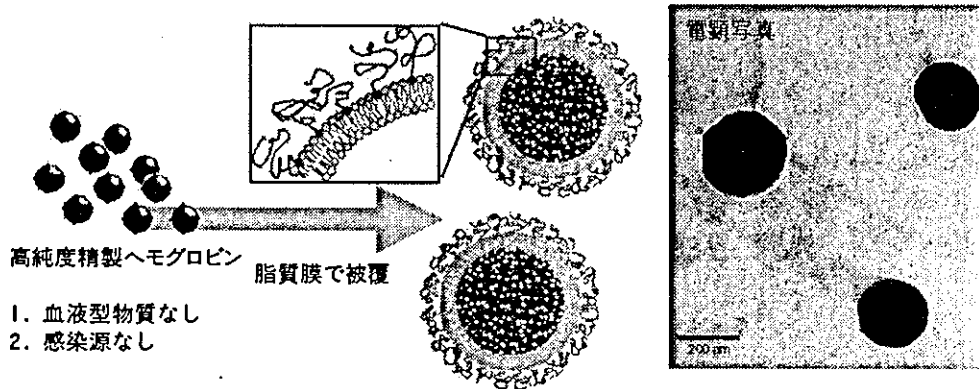


図1 ヘモグロビン小胞体の構造と模式図ならびに透過型電子顕微鏡写真。

は10g/dlであり、ヒト血液の値(11~15g/dl)と比較して遜色ない。また、ヘモグロビン分子が封入されているため製剤の膠質浸透圧はほとんどゼロである。したがって、膠質浸透圧の調節が必要となる場合にはアルブミン(リコンビナント)や多糖類などのコロイド製剤と併用となる。図1の電子顕微鏡写真では、ヘモグロビンの鉄が染色されており、数多くのヘモグロビンが脂質分子膜で包まれた小胞体構造と、粒子径が約250nmに厳密に調節されていることがわかる。これは、赤血球の約1/30程度であるので、梗塞部位の透過など赤血球にはない機能が期待できる。酸素親和度はアロステリック因子、ピリドキサル5-リン酸の共封入により適当値に調節されている。脂質類の成分組成^{と含量}には、ヘモグロビンのカプセル化効率、常温で2年間液状保存できる安定性、血流中での溶血の回避と適度な血中滞留時間(人では3日程度の半減期予測)、血小板や補体の活性化の回避など、に対する工夫が施されている。製造面でも分子集合技術を利用した粒子径の厳密な制御と高濃度ヘモグロビンの内包など、従来の小胞体における課題が解決できている⁹⁾。

ておるし
の粒子径

2. 動物試験による機能と安全性の評価

現在までに結果が得られているヘモグロビン小

胞体に関する評価試験成績を簡単に紹介する。主にラットやハムスターを用いた試験であるが、基本的な安全性と酸素輸送効果は十分確認できている。また、現在霊長類を用いた安全性試験が進行している。酸素運搬効果を確認する試験として、ラット全血液量の90%をアルブミン単独で交換した場合には、70%交換あたりから血圧と腎皮質酸素分圧の低下が顕著となって死亡したが、ヘモグロビン小胞体をアルブミン溶液に分散させた系で90%交換した場合には血圧、腎皮質酸素分圧ともに維持された⁹⁾。ヘモグロビン小胞体のアルブミン分散液によるハムスター80%交換輸血試験では、非侵襲に測定した皮下微小循環系の組織酸素分圧は交換前の60~70%に低下するものの、対照アルブミン投与群よりも5倍以上の値が維持されていた⁹⁾。さらにNZW兔を用いた検討では、人工呼吸下、脱血し平均血圧を30~35mmHgに低下させた後、ヘモグロビン小胞体分散液を投与し、組織酸素分圧の多点測定を実施、とくに脳と腎臓でヘモグロビン小胞体が有意な回復効果を発揮することを明らかにしている⁹⁾。中型動物を用いた実験としてビーグル犬(約7kg)を用い人工呼吸下、脾臓摘出後アルブミンで75%血液希釈後さらに30%脱血し、30分経過後に人工赤血球を投与し、循環動態、血液ガス組成、組織酸素分圧、組織酸素化度、心拍出量、血中酸素濃度の回復が確認されている⁹⁾。

講座 人工赤血球・人工血小板の開発の現状

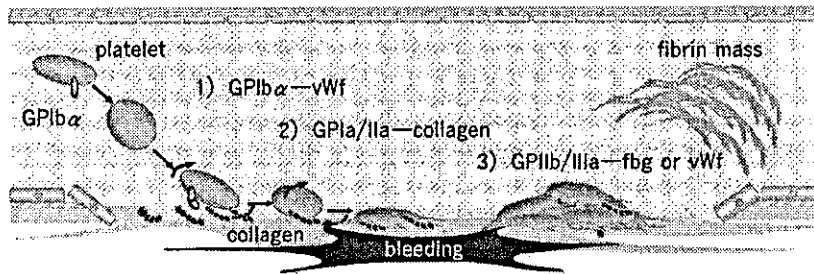
安全面では、血管弛緩因子である一酸化窒素や一酸化炭素が関与してヘモグロビンに認められる抵抗血管の収縮と血圧亢進は、ヘモグロビン小胞体では認められなかった^{8,9)}。これは、ヘモグロビン小胞体の大きさが寄与しているものと思われる。ヘモグロビン小胞体の血中滞留時間は、ラット、ラビット、カニクイザルからヒトへ類推すると、3日程度の半減期¹⁰⁾を見積もられ、緊急時の単回投与では十分とされる。ラットでは、血中半減期が1~1.5日であるので、脾臓や肝臓の病理組織学的所見では、投与1日後には脾臓や肝臓に貪食されていたヘモグロビン小胞体は3日後には激減し、投与7日以内にはほとんど消失していた¹¹⁾。また、ラットでの単回交換投与（循環血液量の40%交換）、反復負荷投与（10 ml/kg/day, 14日間）による血液生化学試験（30項目）や病理試験での詳細から、ヘモグロビン小胞体成分である、脂質分解に関わるリパーゼの亢進、コレステロール値の上昇、鉄の沈着、細網内皮系の肥大が一過性に認められた以外に変動を認めていない¹¹⁾。その他免疫系、凝固系への影響も認められておらず、大量出血時の緊急対応では十分な機能を発現するものと期待されている。

上述のような効果と安全性の高い人工酸素運搬体では、輸血の代替以外にさまざまな適応が検討されている。たとえば体外循環回路補充液として

の利用の検討では、ラット体外循環モデルの作成のため小型人工心肺を試作し、ヘモグロビン小胞体分散液を充填液として使用、血液交換率が50%以上になる条件で灌流させた後、灌流回路中のヘモグロビン小胞体を分離除去して赤血球を回収して投与し、長期生存できることを確認している¹²⁾。虚血性疾患の治療への利用においても、虚血再灌流実験などで小粒径のヘモグロビン小胞体の効果を実証する *in vivo* 実験が進められている。*in vitro* では、微小血管モデル内を流動するヘモグロビン小胞体の酸素放出挙動の解析から、虚血領域酸素化の機序解明を進められている^{13,14)}。人工酸素運搬体は、腫瘍組織酸素化にも有効であることを実証し、新しい適応の可能性を提示された¹⁵⁾。

3. 人工血小板の開発の考え方

血小板は出血部位に対し特異的粘着、伸展、凝集、放出、血液凝固系の活性化などの複雑な機能を持ち、これらのすべてを兼備した血小板代替物の構築は事実上不可能であろう。しかし、血小板の粘着と凝集に着目して、これらの機能を付与させた担体の投与によっても、少数残存する血小板の機能補助ができるものと考えられる。筆者らは慶應義塾大学医学部内科池田康夫教授のグループ



図② 血小板の止血機構。
 一次止血（血小板血栓）
 1) 接着（tethering → rolling）GPIbα-vWf
 2) 粘着（adhesion）GPIa/IIa-collagen
 3) 凝集（aggregation）GPIIb/IIIa-fbg or vWf
 二次止血（フィブリン血栓）

講座 人工赤血球・人工血小板の開発の現状

とともに、血小板膜タンパク質の一部の遺伝子組換え体や合成オリゴペプチドを担持させた微粒子を作成し、これらが血小板を巻き込んで出血部位へ集積することによって止血能が発現されることを期待して、研究を進めている¹⁹⁾。

血小板による止血は、高ずり速度の血流と低ずり速度の血流では機構が異なる。図②に示したように、高ずり速度の出血に対する血小板の止血は、出血部位に露出する血管内皮下組織であるコラーゲンに結合したフォンビルブランド因子(vWf)に対して、血小板が認識して接着して転がることから始まる。in vitro 観測で抗 GPIIb/IIIa 抗体を添加して GPIIb/IIIa の機能を阻害した血小板では、vWf 固定化基板上を流動方向に沿って転がる現象がみられ、この認識能は血小板表面の GPIb/V/IX 複合体の GPIb α 部が担っている¹⁷⁾。次に血小板表面の GPIaIIa ($\alpha_2\beta_1$ インテグリン) や GPVI が直接コラーゲンと相互作用して血小板は粘着し、そこで活性化されると血小板は伸展して顆粒を放出するが、最も重要な過程は GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリン) が活性体となる現象である。フィブリノーゲンは、この活性体を認識して血小板間を架橋し凝集体を形成して一次止血を担う。引き続き凝固系の誘導によるフィブリン塊の形成(二次止血)によって止血が完成する。そこで、高ずり速度の血流下でvWfを介してコラーゲンを認識する GPIb α 、低ずり速度でコラーゲンを直接認識する GPIaIIa、活性化血小板上の GPIIb/IIIa を認識するフィブリノーゲン (Fbg) やその認識部位であるペプチドを候補とした。

4. 人工血小板の研究動向

採血液に抗 GPIIb/IIIa 抗体を添加して GPIIb/IIIa を阻害すると、血小板表面の GPIb α との相互作用によって vWf 固定化基板上を流動方向に沿って転がる現象がみられる。そして、rGPIb α を担持させたリン脂質小胞体でも血小板と同様に vWf 基板上を転がること確認された¹⁹⁾。転がる小胞体の数はずり速度が高くなるほど多くな

り、rGPIb α の特性が確認できた。また、その転がり速度は小胞体を構成する膜の柔軟性と関連した¹⁹⁾。すなわち“柔らかい”小胞体では転がり速度は低くなり、“硬い”小胞体では転がり速度は高くなった。他方、アルブミン重合体は、内部が充填された無定形な綿雪のような形態をとっており、出血部位での充填効果が期待できる。表面に rGPIb α を結合させたところ、小胞体のような vWf 基板を転がる挙動は全く認められず、高ずり速度下でも粘着する挙動が認められた。ラテックスビーズに rGPIb α を結合させた系でも粘着することから、担体が重合体である場合と膜構造をもつ場合では rGPIb α 機能の発現の仕方が異なることが示唆された²⁰⁾。

他方、主に低ずり速度の血流下でコラーゲンに直接結合する血小板膜タンパク質の遺伝子組換え体 (rGPIaIIa) を結合させた小胞体は、コラーゲン基板を特異的に認識して粘着(停止)することが西谷ら²¹⁾によって確認された。また、ずり速度が高くなるにつれ粘着数は減少するが、rGPIb α と rGPIaIIa とともに担持させた小胞体では、低ずり速度から高ずり速度までコラーゲン基板を粘着できる系が構築されている²²⁾。

さらに減少した残存血小板の凝集を補助するために、粘着して活性化した血小板同士を架橋するフィブリノーゲンを結合させたアルブミン重合体も検討した²³⁾。活性化血小板の固定化基板を作成し、フィブリノーゲン結合アルブミン重合体を流動させたところ基板上に一樣に粘着し、抗 GPIIb/IIIa 抗体を添加した系やアルブミン重合体のみでは粘着が抑制された。血小板数が正常値の 1/5 程度に調節された血小板減少モデル血液に添加するフィブリノーゲン結合アルブミン重合体濃度増大とともに流動血小板の粘着数が増大したことから、フィブリノーゲン結合アルブミン重合体は血小板粘着増強効果を有する微粒子であることが示唆された。しかし、フィブリノーゲンは不安定であり、しかも現状ではヒト血液由来となるため、Fbg の γ 鎖 C 末端アミノ酸序列 (H12: HHLGGAKQAGDV) を結合させた系

講座 人工赤血球・人工血小板の開発の現状

を用いた研究を重点的に進めている²⁴⁾。H12結合アルブミン重合体を血小板減少血液（[血小板]= $2.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ ）に添加しコラーゲン基板上に流動させたところ、粘着血小板の占有率が増加し、そこにH12結合アルブミン重合体が巻き込まれていたためH12-polyAlbは血小板凝集を補強する効果があると考えられた。

筆者ら²⁵⁾は抗がん剤であるブスルファン投与の副作用によって血小板が減少したラットを用いて *in vivo* 効果試験を行っている。血小板数が正常値の1/5程度まで減少した状態のラットに対して、セボフルラン麻酔後試料を尾静脈投与した。試料投与5分経過後、尾先端から1cmの部位にクイックヒール（ベクトン・ディッキンソン社製）を用いて傷（長さ2.5mm、深さ1mm）をつけ、尾先端を生理食塩水液に浸して止血時間を計測した。また、試料投与5分前、投与30分後に採血し、各血球変動を観察した。コントロールとして生理食塩液を投与した血小板減少症モデルラット群（[血小板]= $19.8 \pm 2.8/\mu\text{l}$ ）の出血時間は 609 ± 153 秒であり、正常ラット群（[血小板]= $80.9 \pm 8.6/\mu\text{l}$ ）の出血時間（ 178 ± 56 秒）と比較して約3.4倍延長した。H12結合していないアルブミン重合体を40mg/kg投与したところ、出血時間は短縮し（ 184 ± 69 秒）、投与量の減少に伴いその効果は減少した。したがって、アルブミン重合体自体でも止血効果を有することが示唆された。そこで、出血時間に影響しないアルブミン重合体の投与量（4mg/kg）でH12-アルブミン重合体の止血能を検討した。H12-polyAlbの投与では、出血時間 352 ± 73 秒となり出血時間は半分に短縮したが、逆配列H12を結合させたアルブミン重合体では出血時間を短縮させないので、H12の効果を確認された。さらに検体投与5分前、投与30分後に採血し、各血球変動を観察したところ、各検体投与前後における血球変動は生じていないことから、H12-アルブミン重合体は血液適合性の高い微粒子系と思われた。さらにポリエチレングリコールにてアルブミン重合体を表面修飾し、一部のポリエチレングリコール鎖末端

にH12を結合させた系では、投与後3時間後に同様の試験を行っても止血効果が持続していることが確認された。

他方、rGPIaIIaを担持させたアルブミン重合体ではX線照射で血小板数を正常値の1/5程度に減少させたマウスに投与したところ、コントロール群の出血時間（ 730 ± 198 秒）と比較して、投与量依存的に出血時間の短縮が認められた（たとえば 2.4×10^{11} particles/kgでは出血時間は 337 ± 46 秒）²⁶⁾。

現在、GPIIb α を結合させたアルブミン重合体やリポソームの系で *in vivo* 試験が進行中であるが、予想どおりの結果が得られつつあるので、今後はこれらの混合系における最適化を目指している。

おわりに

人工赤血球は臨床試験を目指して、企業がGLP製造を行う段階に入っている。また、人工血小板の研究は、動物試験での効果と安全性を多角的に確認している段階にある。これらの製剤はいずれもわが国が最先端にあるため、有効性や安全性の試験項目や方法の設定やガイドラインの作成に対して迅速で慎重な検討が必要である。そのためには、産官学の共同体制での研究や協議の場として、学会（たとえば日本血液代替物学会や関連学会）の果たす役割と責任も大きいと思われる。産業においては、ナノバイオロジクス領域における具体的な成果として、わが国の近未来医療への貢献はもとより、安全な血液が不足している多くの国に対しても大きな国際貢献と成り得る。必ずしも長期的そして全人類的な視野に立った開発を期待したい。

文献

- 1) 小林絃一：人工赤血球。臨床麻酔 1997；21：1265-70
- 2) 土田英俊，酒井宏水，武岡真司，他：酸素輸液（人工赤血球）。医学のあゆみ 2003；205：558-66
- 3) Sou K, Naito Y, Endo T, et al: Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. Biotechnol Prog 2003；19：1547-52
- 4) Sakai H, Takeoka S, Park SI, et al: Surface

講座 人工赤血球・人工血小板の開発の現状

modification of hemoglobin vesicles with poly (ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* 1997; 8: 23-30

- 5) Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, et al: Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol* 2002; 283: H 1191-9
- 6) 酒井宏水, 堀之内宏久, 武岡真司, 他: ヘモグロビン小胞体による40%血液交換後の回復過程. *人工血液* 2004; 12: 44
- 7) 四津良平: 厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業 "救急災害医療に利用可能な人工赤血球に関する研究" (H15-医薬-014) 平成15年度総括・分担研究報告書
- 8) Sakai H, Hara H, Yuasa M, et al: Molecular dimensions of Hb-based O-2 carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol* 2000; 279: H 908-15
- 9) Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, et al: Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 1999; 277: G 1088-96
- 10) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, et al: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers-Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 2000; 159: 1079-88
- 11) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, et al: Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 874-84
- 12) 山崎真敬, 饗庭了, 四津良平: 人工赤血球を用いた人工心肺充填液のfeasibility test. *人工血液* 2004; 12: 45
- 13) Sakai H, Suzuki Y, Kinoshita M, et al: O₂ release from Hb vesicles evaluated using an artificial, narrow O₂-permeable tube: comparison with RBCs and acellular Hbs. *Am J Physiol-Hert Circ Physiol* 2003; 285: H 2543-51
- 14) 酒井宏水, Pedro Cabrales, Amy G, Tsai, 他: 血流停止させた細動脈内のヘモグロビン小胞体からの酸素放出挙動. *人工血液* 2004; 12: 57
- 15) Sakai H, Suzuki Y, Kinoshita M, et al: O₂ release from Hb vesicles evaluated using an artificial, narrow O-2-permeable tube: comparison with RBCs and acellular Hbs. *Am J Physiol-Hert Circ Physiol* 2003; 285: H 2543-51
- 16) 村田 満: 人工血小板 (血小板代替物). *血液・免疫・腫瘍* 2001; 6: 35-9
- 17) Soslau G, Class R, Morgan DA, et al: Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 2001; 276: 21173-83
- 18) Nishiya T, Murata M, Handa M, et al: Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib α to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 755-60
- 19) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, et al: Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 765-70
- 20) Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, et al: Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib alpha to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 2000; 1: 290-5
- 21) Nishiya T, Kainoh M, Murata M, et al: Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 2002; 100: 136-42
- 22) Kainoh M, Tanaka T: Production of soluble integrin $\alpha_2\beta_1$ heterodimer complex functionally in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 305-10
- 23) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, et al: Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules* 2001; 2: 1192-7
- 24) Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y, et al: Fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 773-9
- 25) Transfusion
- 26) Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, et al: Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 256-60

21) 222
 E 逆に
 7 (2) 7
 24
 (1) 3
 元来 17 下

Okamura Y, Takeoka S, Teramura Y, et al:
 Hemostatic effects of fibrinogen- γ chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles in vitro and in vivo, *Transfusion* 2005; in press.

6 Kobayashi K, Komatsu T, Iwamaru A, et al:

Oxygenation of hypoxic region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic heme, *J Biomed Mater Res Part A* 2003; 64A: 48-51

Reprint from

H. Ishii, M. Suematsu, K. Tanishita, H. Suzuki (Eds.)

Organ Microcirculation

A Gateway to Diagnostic and Therapeutic Interventions

© Springer-Verlag Tokyo 2005

Printed in Japan. Not for Sale.

Design and Modification of Nanoparticles for Blood Substitutes

SHINJI TAKEOKA

Key words. Liposome, Nanoparticle, Hemoglobin, Red-blood-cell substitute, Platelet substitute

Introduction

We have been developing the technology of stabilized and functionalized nanoparticles such as liposomes for 20 years. When phospholipids and cholesterol are dispersed into an aqueous solution, they spontaneously assemble to form vesicles with a bimolecular (bilayer) membrane. There are many parameters, such as size, size distribution, lamellarity (the number of bilayer membranes), membrane fluidity, surface charge, surface modification, membrane permeability, that characterize liposomes. They can be adjusted as needed to allow for changing encapsulation of functional molecules, release triggered by external stimuli, conjugation of functional sites on the surface, rolling or adhesion properties of liposomes, and control of blood circulation time. On the other hand, we have to consider their physical and chemical stability during storage or blood circulation. Surface modification with polyoxyethylene (POE) chains is one of the most effective ways to impart such stabilization.

In this chapter, I introduce two examples of nanoparticle application; one is a liposome encapsulating concentrated hemoglobin (Hb-vesicle) for a red-blood-cell substitute, and the other is a liposome bearing recognition proteins or peptides on the surface and used as a platelet substitute. The microcirculation, pharmacokinetics, and histopathological change were studied in relation to the characteristics of the particles as well as their oxygen-binding and releasing properties. In the case of the platelet substitutes, nanoparticles

bearing receptor proteins of the platelet surface recognize the collagen surface under shear rates. The rolling and adhesion properties will be discussed depending on the stiffness or membrane fluidity of the particles.

Present Status of the Development of Red-Blood-Cell Substitutes [1,2]

Hb-vesicles that encapsulate concentrated hemoglobin with a phospholipids bilayer membrane have a similar structure to red blood cells, and are expected to be used soon in clinical tests because the degree of safety and efficacy are considered to be high. Although effective use of the hemoglobin from donated and expired blood should be promoted at the present stage, recombinant human hemoglobin will be used in the future. During hemoglobin purification from red blood cells, stroma including the glycoproteins which determine a blood type, proteins other than hemoglobin, and the viruses are removed by heating or filter processing. By encapsulating hemoglobin with a stabilized phospholipids membrane with POE-lipid, liquid-state preservation for 2 years is guaranteed at room temperature under nitrogen atmosphere [3], and with dry powder, further prolonged preservation is possible. These points are advantages for an artificial oxygen carrier.

The design of the red-blood-cell substitutes (POE-modified hemoglobin vesicles) are summarized in Fig. 1. Hb-vesicles are dispersed into a saline solution and enclosed with the bottle in a state of deoxidation. The hemoglobin concentration is 10 g/dl and is close to that of human blood. Moreover, because hemoglobin molecules are encapsulated, the colloid osmotic pressure of the solution is zero. Therefore, when regulation of colloid osmotic pressure

is needed, a solution of colloids such as albumin and polysaccharide will be used with the Hb-vesicle dispersion. The particle diameter is strictly adjusted to 250 nm. The degree of oxygen affinity is adjusted to a suitable value by coencapsulating an allosteric effector such as pyridoxal 5'-phosphate. The optimization of the composition of the lipid components resulted in high encapsulation efficiency of hemoglobin in the Hb-vesicle, a stability of 2 years in a liquid state, the prevention of hemolysis, an appropriate lifetime in blood circulation, and avoidance of platelet and complement activation. Furthermore, large-scale manufacturing has been improved by the introduction of freeze-thawing and freeze-drying operations which can control a molecular assembling state before encapsulating hemoglobin molecules.

Present Results of Safety and Efficacy Tests

Although *in vivo* testing was carried out using rats or hamsters, we confirmed the fundamental safety and oxygen transporting ability. Safety tests using primates is in progress. When 90% of the volume of rat blood was exchanged by the albumin dispersion of the Hb-vesicles, the oxygen partial pressure of the renal cortex was maintained as was blood pressure [4]. On the other hand, when the blood was exchanged by an albumin solution in the same concentration, the fall of blood pressure and oxygen partial pressure of the renal cortex became noticeable at 70% exchange, and all rats died just after 90% exchange.

In the hamster 80% exchange transfusion examination with the albumin dispersion of the Hb-vesicles, the noninvasively measured oxygen partial pressure of the subcutaneous tissue microcirculatory system was maintained at 5 times or more than that of the control albumin group although it fell to 60%–70% before exchange [5]. The contraction of a resistance blood vessel and the rise of blood pressure was not confirmed at all, but it was confirmed with modified hemoglobin products. Because the Hb-vesicle has a size that does not penetrate a blood vessel, there is no influence on the activity of nitrogen oxide as an endothelium-derived relaxation factor [6]. Furthermore, the Hb-vesicles cannot penetrate the sinusoidal vessels of liver (several holes 10–200 nm in size are open in the blood vessels) like old red blood cells, but are metabolized by Kupfer cells of liver and macrophages in reticuloendothelial systems. On the other hand, acellular hemoglobin molecules in the liver influenced liver microcirculation by eliminating carbon monoxide as a gaseous vasodilator, caused overgeneration of bilirubin, and suppressed bile secretion [7,8]. The half-life of Hb-vesicles in human blood circulation was estimated to be about three days on the basis of the results in rats, rabbits, and monkey. Moreover, from details of the blood biochemistry examination and pathology examination in the single and repetitive administration, we confirmed the transitional rise of lipase in connection with lipid decomposition, the transitional rise of a cho-

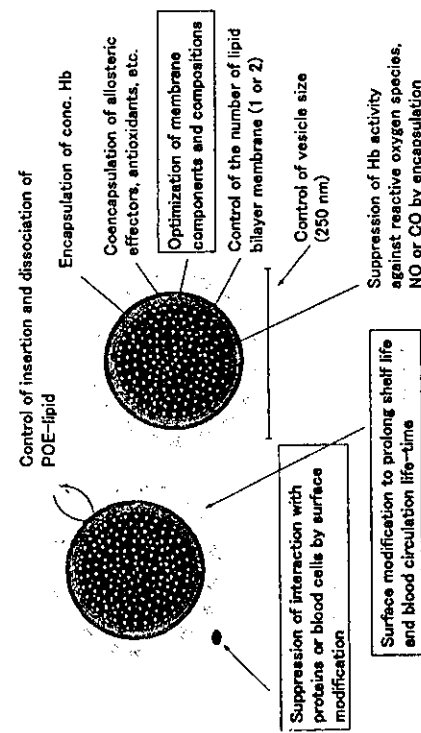


Fig. 1. Design of POE-modified hemoglobin vesicles (Hb-vesicles) as red-blood-cell substitutes

lesterol value, iron content, and the transitional hypertrophy of a reticuloendothelial system [9]. It was concluded that Hb-vesicles are expected to function adequately in cases of extensive bleeding.

Development of Platelet Substitutes

The history of platelet substitutes is short compared with that of red blood cells, with few examples of research. A platelet has complicated functions, such as adhesion specific to the bleeding site, expansion, aggregation, secretion, and the activation of a blood coagulation system. Needless to say, we cannot make platelet substitutes that have these all. However, a bleeding tendency is strongly apparent in such bleeding diseases as Bernard-Soulier syndrome and thrombasthenia, in which adhesion and aggregation ability are lacking. In these conditions, a hemostatic effect can be expected by the infusion of particles having functions such as adhesion and the aggregation of platelets due to the assistance of the function of the remaining platelets. Although clinical tests were carried out with human red blood cells [10] or albumin microcapsules [11] conjugating fibrinogen, and with the dried powder of human platelets [12], all clinical tests were suspended due to problems of safety and efficacy. Moreover, since the blood components of human origin were used, the risk of infection cannot be avoided completely. The platelet substitutes created by our group use liposomes and recombinant human albumin as biocompatible particles. They also use recombinant proteins of the part of platelet membrane or synthetic oligopeptides by conjugating to those particles for the purpose of accumulation to the bleeding site involving native platelets, expecting to achieve hemostasis.

The mechanisms of platelet adhesion differ between the blood flow of high shear rate and that of low shear rate. As shown in Fig. 2, the hemostasis of the platelets to bleeding in a high shear rate begins from a platelet recognition of the von Willebrand factor (vWF) bound to the collagen in the subcutaneous tissue of a blood vessel exposed to the bleeding site, followed by platelet adhesion and rolling. This recognition ability comes from the GPIb/VIX complex containing GPIb α on the surface of a platelet [13]. Next, the platelets will progress and a granule will be secreted if GPIIa/IIIa ($\alpha_2\beta_1$ integrin) or GPVI on the surface of the platelet directly interacts with the collagen and is activated. Fibrinogen recognizes the activated GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin), constructs a crosslink between blood platelets, forms an aggregate, and serves as primary hemostasis. Hemostasis is completed by formation (secondary hemostasis) of the fibrin clot by induction of the coagulation system.

The target platelet substitutes bear the water-soluble part of receptor proteins such as GPIb α which recognizes collagen through vWF under the blood

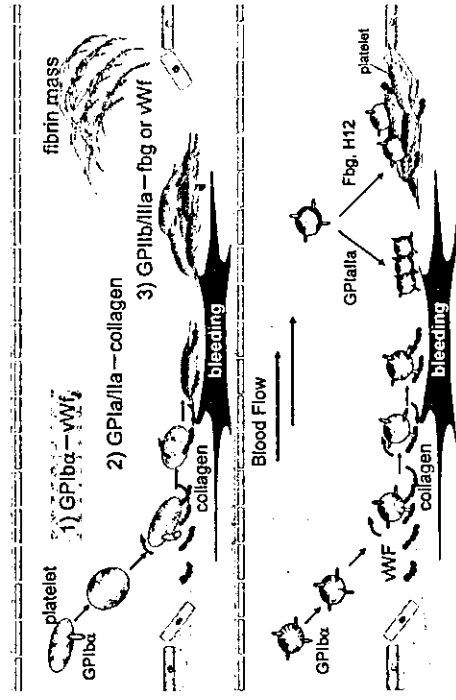


FIG. 2. Design of platelet substitutes studied from functions of natural platelets

flow of high shear rates and GPIIa/IIIa which recognizes collagen directly at low shear rates. Instead of GPIIb/IIIa on the surface of an activated platelet, they bear the fibrinogen or its oligopeptide to assist the platelet aggregation as ligands of the GPIIb/IIIa.

If an anti-GPIIb/IIIa antibody is added to a platelet dispersion to inhibit GPIIb/IIIa activity, the platelets roll on the vWF-immobilized plate along the flow direction by the interaction of rGPIb α on the platelet and the vWF. Interestingly, phospholipid liposomes conjugating rGPIb α roll on the vWF-immobilized plate as well [14]. The number of the rolling liposomes increased with the shear rate, indicating the characteristic of rGPIb α . Moreover, the rolling speed was correlated with the membrane fluidity of the liposomes. That is, the rolling speed of "soft" liposomes was low, whereas that of the "hard" liposomes was high [15]. However, the rGPIb α -liposomes did not continue rolling but departed from the plate after rolling some length. This was remarkable as the "soft" liposomes. When the amount of rGPIb α on the surface of the liposome after the experiment was measured, it was suggested that rGPIb α -lipid should dissociate from the bilayer membrane during the rolling on the vWF-plate. Now rGPIb α -lipid which cannot dissociate serves as a point of a molecular design.

On the other hand, the rGPIIa/IIIa-liposomes directly recognize collagen under the blood flow of low shear rates and adhered to (stopped at) the collagen-immobilized plate [16]. In this case, the number of the adhering liposomes decreased as the shear rate rose. However, liposomes conjugating both rGPIb α and GPIIa/IIIa adhered on the collagen plate under the blood flow from low to high shear rates [17]. If the liposomes having platelet activation factors

or coagulation factors in the internal aqueous phase accumulate at the bleeding site, they will be able to contribute effectively to hemostasis by releasing their contents. We also focused on using polymerized albumin particles as effective platelet substitutes and obtained some unique *in vitro* and *in vivo* results [18,19].

Conclusions

For red-blood-cell substitutes the present target is the supportive treatment of transfusion therapy in emergency, and nonclinical and clinical studies will be scheduled within 2 years.

On the other hand, the research of platelet substitutes has just started. There is a conflict between the carrier design for the extension of circulation lifetime and the carrier design to show the hemostatic activity by recognizing the bleeding site; therefore, we need to resolve this conflict and to design platelet substitutes for prophylactic or chronic treatments. And we also need a method to confirm that the candidate does not create a thrombus in blood circulation.

Although profitability is important in the development of blood substitutes, one that is based on a long-term view with consideration for human beings is expected first. At present, as many discoveries about the dynamic function of platelets have accumulated in a short period of time with the progress of biotechnology and opto-electronics, and the manufacturing technology of recombinant proteins or carriers is progressing, a usable product is sure to be invented in the near future.

Acknowledgments. The author thanks Drs. E. Tsuchida, H. Sakai, K. Sou, Y. Teramura, and Y. Okamura at Waseda University, and Drs. K. Kobayashi, Y. Ikeda, M. Suematsu, H. Horinouchi, M. Handa, and M. Murata at Keio University for useful discussions and suggestions. This work was supported in part by Health and Labor Sciences Research Grants (Research on Pharmaceutical and Medical Safety); the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan; and Grants-in-Aid from the JSPS, Japan, and 21COE "Practical Nano-Chemistry" from MEXT, Japan.

References


1. Tsuchida E (ed) (1995) Artificial red cells: materials, performances and clinical study as blood substitutes. Wiley, Chichester
2. Tsuchida E (ed) (1998) Blood substitutes: present and future perspectives. Elsevier, Amsterdam
3. Sakai H, Tomiyama K, Sou K, et al (2000) Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconj Chem* 11:425-432
4. Sakai H, Takeoka S, Park SJ, et al (1997) Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconj Chem* 8:23-30
5. Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, et al (2002) Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol* 283:H1191-H1199
6. Sakai H, Hara H, Yuasa M, et al (2000) Molecular dimensions of Hb-based O-2 carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol* 279:H908-H915
7. Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, et al (1999) Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 277:G1088-G1096
8. Kyokane T, Norimizu S, Taniai H, et al (2001) Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 120:1227-1240
9. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, et al (2000) Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 159:1079-1088
10. Agam G, Livne AA (1992) Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 22:105-112
11. Levi M, Friderich P, Ten CW, et al (1999) Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 5:107-111
12. Chao F, Reddick RL, Bode AB, et al (1996) Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion* 36:536-542
13. Soslaw G, Class R, Morgan DA, et al (2001) Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 276:21173-21183
14. Nishiya T, Murata M, Handa M, et al (2000) Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib α to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 270:755-760
15. Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, et al (2002) Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 296:765-770
16. Kainoh M, Tanaka T (2002) Production of soluble integrin α 2b1 heterodimer complex functionally *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 290:305-310
17. Nishiya T, Kainoh M, Murata M, et al (2002) Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 100:136-142
18. Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, et al (2000) Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 1:290-295
19. Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, et al (2003) Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 306:256-260

K. Kobayashi, E. Tsuchida,
H. Horinouchi (Eds.)

Artificial Oxygen Carrier

Its Front Line

With 75 Figures, Including 7 in Color

 Springer