

## 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<sup>1-6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>5,6)</sup>。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、最新の話題を紹介したい。

### 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<sup>2)</sup>。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<sup>5)</sup>。酸素親和性 ( $P_{50}$ ) は 30~36 Torr で赤血球 ( $P_{50}$ : 27 Torr) に近く、酸素錯体半減期 ( $\tau_{50}$ : 9 hr) はミオグロビンの値に匹敵する。

### 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<sup>8-10)</sup>。rHSA-heme の一酸化窒素親和性を測定したところ、

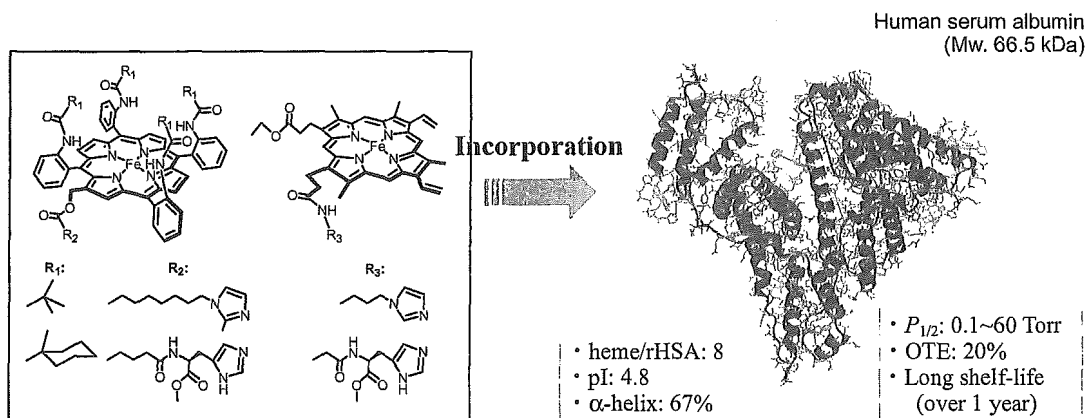


Figure 1 Synthetic hemes and simulated structure of rHSA-heme hybrid.

Hb より 9 倍高いことが明らかとなった<sup>4)</sup>。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)<sup>11)</sup>。rHSA-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に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。

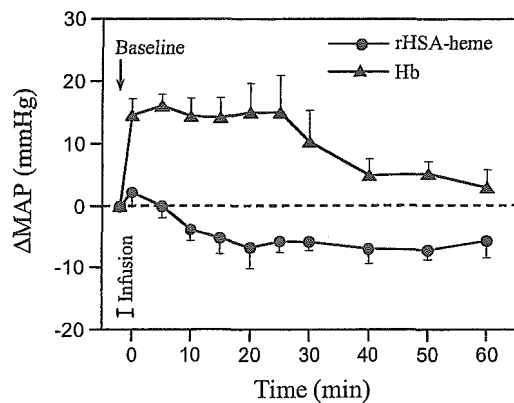


Figure 2 Changes of mean arterial pressure (MAP) after administration of rHSA-heme solution in anesthetized rats.

#### 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<sup>12)</sup>。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、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、2 hr 後でもその値は維持された。

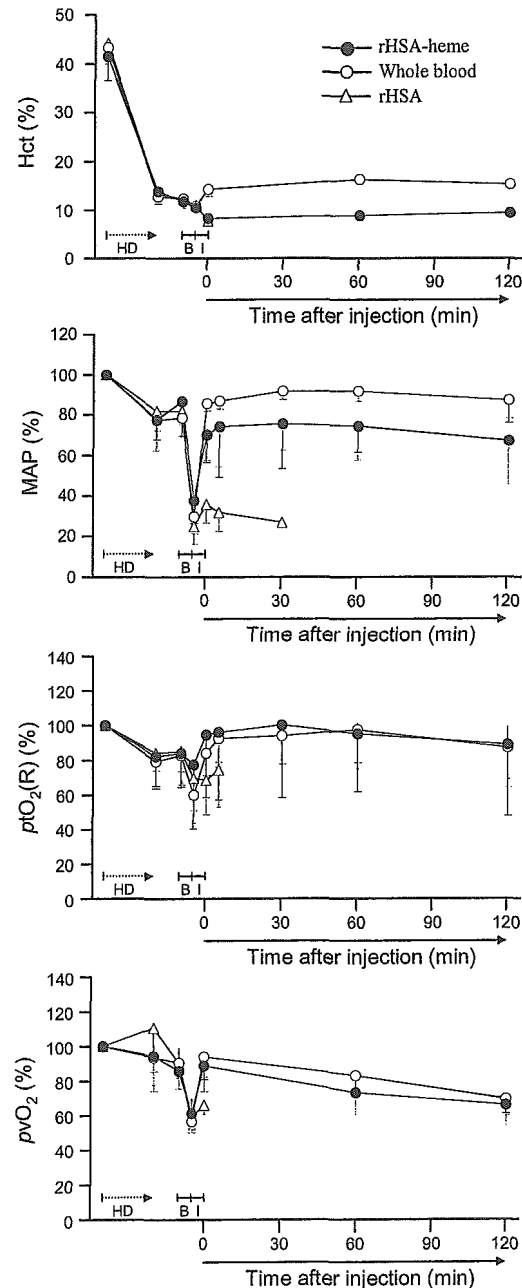


Figure 3 Changes of Hct, mean arterial pressure (MAP), renal cortical  $O_2$ -tension ( $PtO_2(R)$ ), venous blood  $O_2$ -tension ( $PvO_2$ ) after administration of rHSA-heme solution in anesthetized rats. HD: hemodilution with rHSA, B: 30% bleeding, I: sample infusion.

## 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<sup>13)</sup>。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。

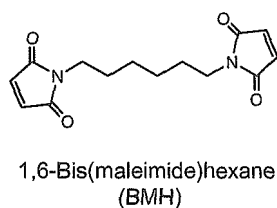


Figure 4 Simulated structure of cross-linked rHSA dimer with BMH.

## 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。

## 【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.

## 【輸血医療のトピックス】 人工血液（人工赤血球）の開発動向

武岡真司\*

キーワード◎ 人工血液 人工赤血球 ヘモグロビン小胞体 機能と安全性評価

### はじめに

われわれは常にウイルスの猛威に曝されており、血液事業も大きな影響を受けている。わが国では、平成9年度から厚生科学研究 高度先端医療研究事業「人工血液開発分野」が設置され、人工赤血球、人工血小板、人工抗体の3部門に分かれた本格的な研究展開が進められてきた。人工血液は、現行の輸血用血液製剤を補完し、安全な製剤の安定供給の観点から、21世紀の医療の進歩に大きな影響を与えうると期待されている。わが国においても、人工血液の製品化に向けた研究開発の促進が国の基本方針（平成14年7月24日衆議院厚生労働委員会決議、医薬品・医療機器の安全対策の推進に関する件）となっている。

本稿では、実現が見えてきた人工赤血球に焦点を絞るが、この実現により、①緊急時に血液型を選ばずに輸血ができ、②HIV、肝炎やその他、未知のウイルスも含めたウイルスや細菌の感染症の心配がなく、③大量備蓄可能であるので大震災などの災害時などにも即応が可能、などが期待される。



\*たけおか・しんじ：早稲田大学理工学部助教授。平成3年早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了(工学博士)。平成2年日本学術振興会特別研究員。平成3年早稲田大学理工学部助手。平成5年同専任講師。平成8年現職。主研究領域／高分子化学、分子集合科学、人工血液、薬物運搬体。

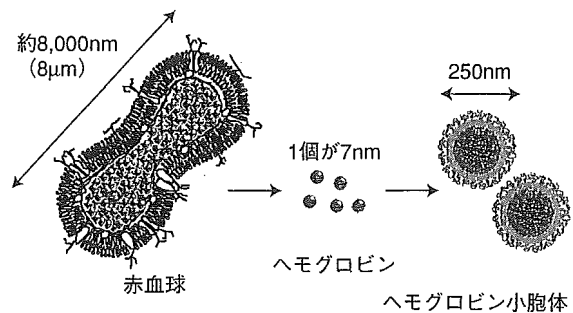


図1 赤血球から精製したヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の構築

### I. 人工赤血球開発の現状

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。現在わが国を中心に研究が進められている、高濃度ヘモグロビンをリン脂質の二分子膜で包み込んだ、赤血球と類似のヘモグロビン小胞体 (hemoglobin vesicles; HbV) (図1)が最も安全度が高く、実用が期待されている<sup>1,2)</sup>。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、将来的にはヘモグロビンは遺伝子組換え体が利用されるであろう。

赤血球からのヘモグロビン精製時に血液型を決める型物質やヘモグロビン以外の蛋白質、ウイルス(もし含まれたとしても)が、加熱やフィルター処理で完全に除去される。安定なリン脂質膜で包み直すため、室温で2年間の液状保存

表1 ヘモグロビン小胞体の規格

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

\* 20%遺伝子組換えヒト血清アルブミン製剤と混合後  
PEG: ポリエチレングリコール

(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ため、人工物の大きな長所とされている。

ヘモグロビン小胞体は、筆者の所属する早稲田大学理工学総合研究センター土田英俊名誉教授の研究グループと慶應義塾大学医学部小林紘一教授、末松 誠教授の研究グループを中心とした共同研究(厚生労働科学研究費補助金による)が中心となって進められており、民間会社との連携によって、製剤化と早期の臨床試験着手を目指している。

## II. ヘモグロビン小胞体の機能と安全性評価

ヘモグロビン小胞体制剤の物性規格を表1にまとめた。ヘモグロビンがカプセル化されているため膠質浸透圧はほとんどゼロである。赤血球が生食に分散した状態と考えていただきたい。したがって、膠質浸透圧の調節が必要となる場合には(遺伝子組換え)ヒト血清アルブミ

ンなどと併用となる。粒径は250nmに厳密に調節されており、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(PLP)の共封入によって適当値に調節可能である。脂質類の成分組成や含量には工夫が施されており、常温で2年間液状保存<sup>3)</sup>、血流中での溶血の回避と適度な血中滞留時間(ヒトでは3日程度の予測)、血小板や補体の活性化の回避など、従来の小胞体における課題が解決できている。

以下に、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。

酸素運搬効果をみるためのラット全血液量の90%をアルブミン単独で交換した場合には、70%交換辺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、腎皮質酸素分圧共に維持された<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。さらには、修飾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全く認めなかった。これは、ヘモグロビン小胞体は血管を透過しない大きさであるので、血管内皮由来弛緩因子である一酸化窒素への影響はほとんどないと考えられている<sup>6)</sup>。

ラット25%<sup>99m</sup>Tc標識ヘモグロビン小胞体負荷試験では、血中半減期はほぼ35時間程度であった。ヘモグロビン小胞体は、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 20ml/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ヘモグロビン小胞体は、1週間後にはほとんど消失した。肝機能・腎機能には特に異常を認めず、リパーゼは有意な一過性の亢進を示したが、アミラーゼには変動は認められなかった<sup>7)</sup>。代謝過程で、脂質成分、特にコレステロールが血清中に出現し、7日後には正常値に戻った。

さらに、ラット (10ml/kg/日)での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、生化学検査では脂質成分とリパーゼの一過性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<sup>8)</sup>。

代謝臓器である肝臓では、ヘモグロビンでは内因性一酸化炭素を消去し、ビリルビンの過剰生成と胆汁分泌機能の低下を招来したが、ヘモグロビン小胞体ではそのような作用を認めなかった<sup>9,10)</sup>。

ヘモグロビンは、自動酸化や活性酸素との反応によってヘム鉄が2価から3価に酸化 (メト化) すると、酸素を結合できなくなる。メト体はFe<sup>3+</sup>イオンを遊離し、これがフェントン反応を誘導してヒドロキシラジカルの発生を触媒する。ところが、ヘモグロビン小胞体の場合、ヘモグロビンは脂質二分子膜で被覆されているため、活性酸素が関連する反応はヘモグロビン小胞体の外へ影響を及ぼさないことが*in vitro*試験で確認されている<sup>11)</sup>。細網内皮系にて代謝されたヘモグロビン小胞体由来の鉄の動態に関しては、今後の研究が待たれるところであろう。

## まとめ

人工赤血球は、救急救命における輸血療法の補完を当面の目標としており、役目が終われば

比較的すみやかに代謝臓器で代謝され、生合成される自身の赤血球と置き換わる。また、遺伝子組換えアルブミンにヘム誘導体を複合させたアルブミン-ヘムは、膠質浸透圧ももった酸素運搬体であり、ヘモグロビン小胞体よりも小さな粒子径などの特徴を活かした新しい酸素療法などへの適用も期待されている<sup>9)</sup>。また、人工血小板も慶應義塾大学医学部池田康夫教授の研究グループで最先端の研究が行われており、*in vivo*成績が得られつつある<sup>12)</sup>。

このように、人工赤血球、人工血小板は、わが国では主に厚生労働科学研究補助金にて研究が進められているが、これは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なりうる。民間で行うには採算性も重要であるが、まずは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) 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: 558-566.
- 2) 土田英俊, 宗慶太郎, 酒井宏水他: 酸素輸液 (人工赤血球) の安全度と体組織への酸素供給. 麻酔 2003; 52 (増): S55-S66.
- 3) Sakai H, Tomiyama KI, Sou K, *et al*: Poly (ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug Chem* 2000; 11: 425-432.
- 4) 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. *Bioconjug 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 Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1191-H1199.
- 6) Sakai H, Hara H, Yuasa M, *et al*: Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H908-H915.
- 7) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, *et al*: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothe-

- 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction and lipid peroxidation. *Bioconjug 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.
-

# 酸素輸液の展望

## 1) 小胞体型人工赤血球の開発動向

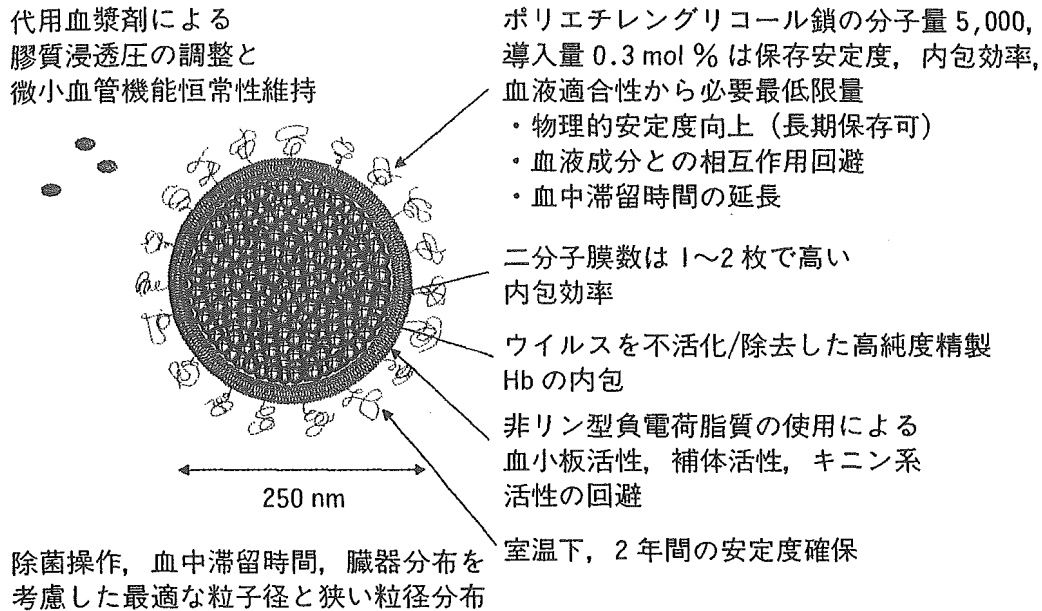
### ① 人工赤血球の必要性

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、有効性及び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<sup>1,2)</sup>. 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 は遺伝子組換え体が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 <sub>50</sub> (torr)	27~34
[Hb] (g/dl)	10.0±0.4 (8.6±0.4 <sup>a)</sup> )
[総脂質] (g/dl)	4.6~5.4 (5.3~5.9 <sup>a)</sup> )
[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 <sup>-1</sup> )	2~3 (3~4 <sup>a)</sup> )
晶質浸透圧 (mOsm)	300
膠質浸透圧 (Torr)	0 (20 <sup>a)</sup> )
pH (37°C)	7.4
エンドトキシン (EU/ml)	<0.1
無菌試験	検出なし

<sup>a)</sup>: 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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup> 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<sup>6)</sup>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% <sup>99m</sup>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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>、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<sup>9)</sup> 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<sup>10)</sup>。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<sup>11,12)</sup>。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<sup>13)</sup>。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<sup>14)</sup>。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<sup>15)</sup>。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<sup>16)</sup>。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<sup>17)</sup>。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<sup>18)</sup>。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<sup>18)</sup>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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, Taniyai 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)

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



Department of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Waseda University,  
3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

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 deoxidization. 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

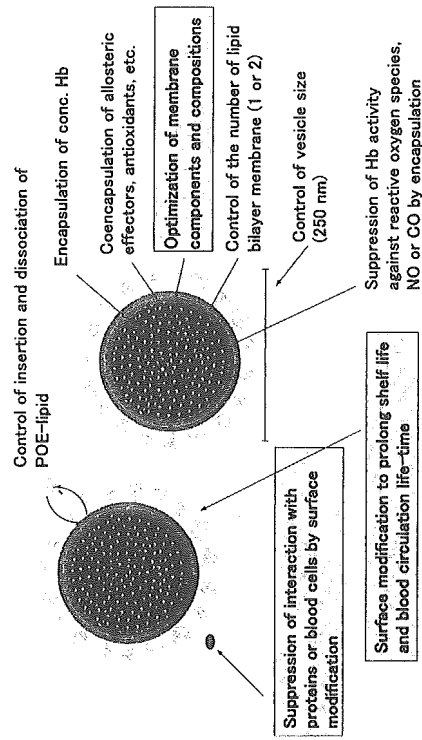


Fig. 1. Design of POE-modified hemoglobin vesicles (Hb-vesicles) as red-blood-cell substitutes

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-



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 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/V/IX complex containing GPIb $\alpha$  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 $\alpha$  which recognizes collagen through vWf under the blood

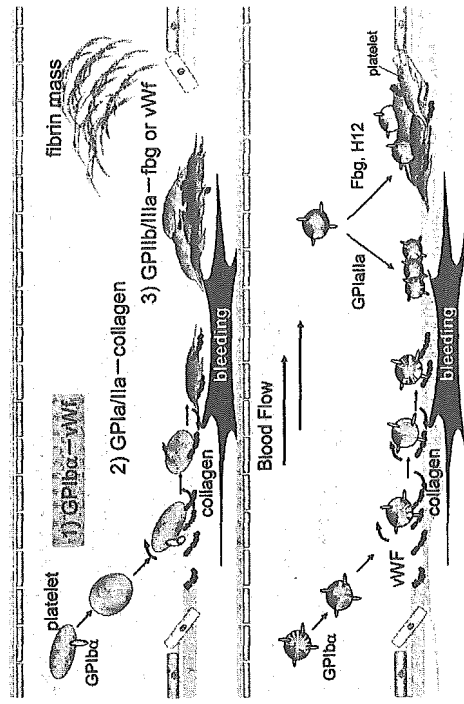


Fig. 2. Design of platelet substitutes studied from functions of natural platelets

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 $\alpha$  on the platelet and the vWf. Interestingly, phospholipid liposomes conjugating rGPIb $\alpha$  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 $\alpha$ . 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 $\alpha$ -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 $\alpha$  on the surface of the liposome after the experiment was measured, it was suggested that rGPIb $\alpha$ -lipid should dissociate from the bilayer membrane during the rolling on the vWf-plate. Now rGPIb $\alpha$ -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 $\alpha$  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 optoelectronics, 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 ZICOE "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. *Bioconjug Chem* 11:425-432
4. Sakai H, Takeoka S, Park SI, 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. *Bioconjug 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, Ianiai 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 AR, et al (1996) Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion* 36:536-542
13. Soslau 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 $\alpha$  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 rGP1b $\alpha$ -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  $\alpha 2\beta 1$  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 $\alpha$  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 alpha 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 rGP1a/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

# Safety and Efficacy of Hemoglobin-Vesicles and Albumin-Hemes

K. KOBAYASHI<sup>1</sup>, H. HORINOUCHE<sup>1</sup>, M. WATANABE<sup>1</sup>, Y. IZUMI<sup>1</sup>, Y. TERAMURA<sup>2</sup>,  
A. NAKAGAWA<sup>2</sup>, Y. HUANG<sup>2</sup>, K. SOU<sup>2</sup>, H. SAKAI<sup>2</sup>, T. KOMATSU<sup>2</sup>, S. TAKEOKA<sup>2</sup>,  
and E. TSUCHIDA<sup>2</sup>

*Summary.* Keio University and Waseda University have worked together on artificial O<sub>2</sub> carrier research for 20 years in close cooperation. Two candidate materials have been selected from the viewpoints of safety, efficacy, and cost performance. One is Hemoglobin-vesicles (HbV) and the other is albumin-heme (rHSA-heme). This chapter summarizes our video presentation that introduced the recent results of our research into HbV and rHSA-heme.

*Key words.* Blood substitutes, Oxygen carriers, Hemoglobin-vesicles, Albumin-heme, Oxygen therapeutics

## Introduction: Keio-Waseda Joint Research Project

For human beings to survive, it is necessary to continuously deliver oxygen that is needed for the respiration of all tissue cells. Red blood cell, a so-called moving internal-organ, reversibly binds and releases O<sub>2</sub> under physiological conditions. From this point of view, red blood cell substitutes, or O<sub>2</sub>-Infusions, are very important. In order to promote this research, we have emphasized that the establishment of basic science for macromolecular complexes and molecular assemblies is essential. We have systematically studied the Metal Complexes (synthetic heme derivatives) embedded into a hydrophobic cluster, and clarified that the electronic processes of the active sites are controlled by the surrounding molecular environment. Therefore, the reaction activity and its rate constant are observed as cooperative phenomena with the

---

<sup>1</sup> Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>2</sup> Advanced Research Institute for Science & Engineering, Waseda University, 3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan