

# Performances of PEG-modified hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers in microcirculation

Hiromi Sakai\* and Eishun Tsuchida

*Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, Tokyo 169-8555, Japan*

**Abstract.** Hemoglobin-Vesicles (HbV; diameter, 250 nm) are artificial O<sub>2</sub> carriers encapsulating purified and concentrated human Hb solution in phospholipid vesicles (liposomes), and their safety and efficacy, as a transfusion alternative, have been studied. In this paper, we summarized the characteristics of HbV that have been clarified by the microcirculatory observations.

**Keywords:** Blood substitutes, liposome, microcirculation, EDRF, oxygenation

## 1. Introduction

Hemoglobin (Hb)-based O<sub>2</sub> carriers (HBOCs) have been developed for use as a transfusion alternative and some of them are now in the process of clinical trials [1]. The advantages of the HBOCs are the absence of blood-type antigenicity and infectious pathogens, and stability for long-term storage when compared with the RBC transfusion [2–4]. A phospholipid vesicle or liposome encapsulating concentrated human Hb (Hb-vesicle, HbV) has been developed as an O<sub>2</sub> carrier [2,5–9]. The cellular structure of the HbV (particle diameter, ca. 250 nm) has characteristics similar to those of natural RBCs, since both have lipid bilayer membranes that prevent the direct contact of Hb with the components of blood and the endothelial lining [10]. The reasons for the Hb encapsulation in RBCs should be: (1) a decrease in the high viscosity of Hb and a high colloidal osmotic pressure; (2) prevention of the removal of hemoglobin from the blood circulation; and (3) preservation of the chemical environment in the cells such as the concentration of phosphates (2,3-DPG, ATP, etc.) and other electrolytes. Moreover, during the long history of the development of HBOCs, many side effects of molecular Hb have become apparent. These side effects of molecular Hb would imply the importance of the cellular structure.

Our *in vivo* studies of HbV have revealed the sufficient O<sub>2</sub> transporting efficiency comparable to RBCs [11–14], the safety in terms of blood compatibility [15], and prompt degradation in the reticuloendothelial system [16–19], all of which make us confident about advancing to the further development of HbV.

In this paper, we focus on the performances of our polyethylene-glycol (PEG)-modified HbV from the viewpoint of hemorheology and microcirculation.

---

\*Corresponding author. E-mail: hiromi@waseda.jp.

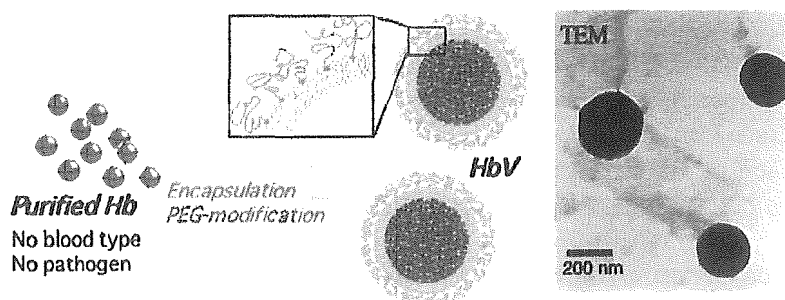


Fig. 1. Hemoglobin-vesicles (HbV) encapsulate the ultrapurified and concentrated human Hb solution (35 g/dl) with phospholipid bilayer membrane, and the surface is modified with polyethylene glycol chains. The well-regulated particle size (about 250 nm) was confirmed by TEM. One particle contains about 30,000 Hb molecules and about 1500 PEG chains were fixed on the surface.

## 2. Impact of PEG-modification of HbV

The rheological property of an HBOC is important because the infusion amount should be significantly large and that may affect the blood viscosity and hemodynamics. One HbV contains about 30,000 Hb molecules so that the suspension of HbV does not have colloid osmotic pressure (COP) (Fig. 1). The HbV suspended in 5 g/dl human serum albumin (HSA) at  $[Hb] = 10$  g/dl shows comparable COP and viscosity to the blood.

We tested the function of PEG-modified and unmodified HbV as a blood replacement in the subcutaneous microvasculature of awake hamsters during severe hemodilution in which 80% of the red blood cell mass (70 ml/kg) was substituted with suspensions of the vesicles in 5% HSA solution [20,21]. Both materials yielded normal mean arterial pressure, heart rate, and blood gas parameters, which could not be achieved with albumin alone. Subcutaneous microvascular studies showed that PEG-modified HbV/HSA significantly improved microhemodynamic conditions (flow rate, functional capillary density, vessel diameter, and  $O_2$  tension) relative to unmodified HbV/HSA. PEG-modified HbV was homogeneously dispersed in the plasma phase while the unmodified HbV showed aggregation in venules and capillaries. Even though it was confirmed *in vitro* that the aggregates dissociated reversibly at higher shear rates, it is unlikely that they would dissociate in vessels where the flow rate or shear stress was low. Aggregation and decreased flow rate may constitute a vicious circle that reinforces negative effects on blood flow. PEG reduced vesicular aggregation and viscosity, improving microvascular perfusion relative to the unmodified type. From this result, PEG modification is important for HbV in microvascular blood flow.

## 3. Interaction with NO and CO

As clinical trials of the chemically modified Hbs are extended to include larger numbers of individuals, it becomes apparent that the principal side effect consistently reported in the administration of acellular Hb solutions is hypertension presumably because of vasoconstriction. Hypertension, a well-defined reaction of the acellular intramolecularly cross-linked Hb (XLHb), was proposed to be beneficial in the treatment of hypotension concomitant to hemorrhagic shock [22]. However, vasoconstriction reduces blood flow, lowering functional capillary density, and therefore affecting tissue perfusion and oxygenation [23,24]. Nitric oxide (NO) scavenging by Hb due to intrinsic high affinity of NO to Hb is the mechanism presumed to cause vasoconstriction and hypertension [25,26].

We analyzed the relationship between the constriction of resistance vessel and hypertension after administration of acellular Hb and the extent to which the effect is dependent on the size of acellular Hb molecules modified by polymerization, polymer conjugation, and cellular liposome encapsulation [8,27]. Conscious Syrian golden hamsters with dorsal skinfold preparation were used. After the top load infusion of Hb products (7 ml/kg) into arterial catheter into jugular vein, mean arterial pressure, and heart rate were monitored through jugular arterial catheter, and microvascular responses were monitored by an intravital microscopy. The Hb products included intra-molecularly crosslinked Hb (XLHb), PEG-conjugated pyridoxalated Hb (PEG-PLP-Hb), hydroxyethylstarch-conjugated XLHb (HES-XLHb), glutaraldehyde-polymerized XLHb (Poly-XLHb) and HbV. Their molecular diameters were 7, 22, 68 and 224 nm, respectively. The top load infusion of 7 ml/kg of XLHb (5 g/dl) caused the immediate increase of MAP, which was  $34 \pm 13$  mmHg higher 3 hrs after infusion. There was a simultaneous decrease in diameter of  $A_0$  vessels ( $79 \pm 8\%$  of basal value), which caused blood flow to decrease throughout the microvascular network. The diameter of smaller arterioles did not change significantly. Infusion of HBOCs of greater molecular size resulted in lesser vasoconstriction and hypertension with HbV showing the smallest changes. Infusion of HSA was used as control and produced no microvascular or systemic effects. Constriction of resistance arteries was found to be correlated to the level of hypertension, and the responses proportional to the molecular dimensions of HBOCs. Since the results correlate with molecular size it is likely that the effects are related to the diffusion properties of the different hemoglobin molecules.

The liver is a major organ that detoxifies excess amount of heme by the action of heme oxygenase (HO). HO decomposes protoheme IX to generate biliverdin-IXa and CO. Under normal conditions, liver contains at least two OH isozymes for physiologic degradation of the heme: HO-1 and HO-2. One of the important roles of the HO reaction is to generate CO that serves as an endogenous regulator that is necessary for maintaining microvascular blood flow [28]. Since Hb strongly binds with CO (about 200 times stronger than  $O_2$ ), it is necessary to confirm the effects of HbV in hepatic microcirculation in comparison with stroma free Hb solution. Suematsu et al. studied the perfusion of a rat liver with an acellular Hb solution and HbV, and found out that the Hb solution increased vascular resistance by 30% [29]. The smaller acellular Hb molecules (7 nm) extravasate across the fenestrated endothelium with a pore size of about 100 nm, and reach to the space of Disse. Heme is excessively metabolized by hemeoxygenase-2 to produce CO and bilirubin. Even though CO acts as a vasorelaxation factor in the liver, the excess amount of Hb in the space of Disse rapidly binds CO, resulting in the vasoconstriction and the increase in vascular resistance. On the other hand, Hb-vesicle (250 nm) is large enough to maintain in the sinusoid, and the vascular resistance is maintained.

These results indicate the importance of the size of the oxygen carriers, and the size of HbV is appropriate for the maintenance of microvascular blood flow.

#### 4. Oxygen releasing behavior of HbV and oxygen therapeutics

We measured the  $O_2$  release from HbV perfused through an  $O_2$  permeable fluorinated ethylenepropylene copolymer tube (inner diameter,  $28 \mu\text{m}$ ), that was exposed to a deoxygenated environment [30] (Fig. 2). The addition of HbV to RBC did not influence on the  $O_2$ -releasing rate. On the other hand, the addition of 50-vol% acellular Hb solution to RBC significantly enhanced the rate of deoxygenation. This outstanding difference in the rate of the  $O_2$  release between the HbV suspension and the acellular Hb solution should mainly be due to the difference in the particle size (250 vs. 7 nm) that affects their

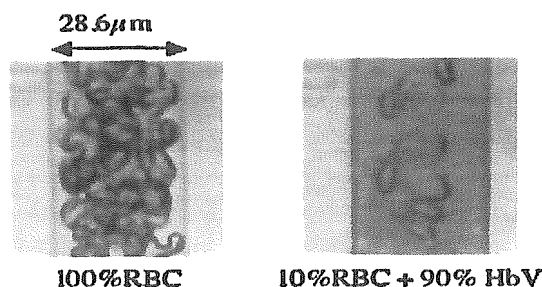


Fig. 2. Flow patterns of RBCs mixed with HbVs suspended in human serum albumin in a narrow tube (diameter,  $28.6 \mu\text{m}$ ) [30]. RBCs tended to flow in the centerline, while the HbV particles were homogeneously dispersed in a suspension medium. The individual particles could not be seen at this magnification. However, semitransparent elements were seen in the suspension medium, indicating the presence of HbV. This experimental model, developed by Maeda et al., was used to analyze the  $\text{O}_2$  releasing behavior of HbV and RBC.  $[\text{Hb}] = 10 \text{ g/dl}$ ; centerline flow velocity,  $1 \text{ mm/s}$ .

diffusion for the facilitated  $\text{O}_2$  transport. It has been suggested that the faster  $\text{O}_2$  unloading from the HBOCs is advantageous for tissue oxygenation [31]. However, this concept is controversial regarding the recent findings since an excess  $\text{O}_2$  supply would cause autoregulatory vasoconstriction and microcirculatory disorders [24,32]. We confirmed that HbV does not induce vasoconstriction and hypertension, due to not only the reduced inactivation of NO as an endothelium-derived vasorelaxation factor, but also possibly the moderate  $\text{O}_2$  releasing rate similar to RBC as confirmed in this study.

One characteristic of HbV is that the  $\text{O}_2$  affinity ( $P_{50}$ ) of Hb can be easily regulated by the amount of coencapsulated allosteric effector, pyridoxal 5'-phosphate [21]. It has been clarified by Erni et al. that oxygenation of an ischemic skin flap, where one branch of feeding arteriole was ligated, was improved by infusion of HbV with a high  $\text{O}_2$  affinity (low  $P_{50}$ ) [33,34]. To clarify the underlying mechanism of ischemic tissue oxygenation, we prepared two HbVs with different  $P_{50}$ s (8 and 29 mmHg, termed HbV<sub>8</sub> and HbV<sub>29</sub>, respectively), and observed their  $\text{O}_2$  releasing behavior from an occluded arteriole in a hamster skinfold window model [35]. Conscious hamsters received HbV<sub>8</sub> or HbV<sub>29</sub> at the dose rate of  $7 \text{ ml/kg bw}$ . In the microscopic view, an arteriole (diameter:  $53.0 \pm 6.6 \mu\text{m}$ ) was occluded transcutaneously by a glass pipette on a manipulator and the reduction of the intra arteriolar  $\text{O}_2$  tension ( $p\text{O}_2$ )  $100 \mu\text{m}$  down from the occlusion was measured by the phosphorescence quenching of pre-infused Pd-porphyrin. The baseline arteriolar  $p\text{O}_2$  ( $50\text{--}52 \text{ mmHg}$ ) decreased to about  $5 \text{ mmHg}$  for all the groups. Occlusion after HbV<sub>8</sub> infusion showed slightly slower rate of  $p\text{O}_2$  reduction in comparison with that after HbV<sub>29</sub> infusion. The arteriolar  $\text{O}_2$  content was calculated at each reducing  $p\text{O}_2$  in combination with the  $\text{O}_2$  equilibrium curves of HbVs, and it was clarified that HbV<sub>8</sub> showed significantly slower rate of  $\text{O}_2$  release in comparison with HbV<sub>29</sub> and was a primary source of  $\text{O}_2$  (maximum fraction, 0.55) overwhelming RBCs when the  $p\text{O}_2$  was reduced (e.g.,  $<10 \text{ mmHg}$ ) in spite of a small dosage of HbV.

Accordingly, the result of improved oxygenation of the ischemic skin flap, observed by Erni et al., could be explained by low  $P_{50}$  HbVs retaining  $\text{O}_2$  in the upstream vessels and delivering it to the ischemic tissue via collateral arterioles, even when these may have significantly slower blood flow. Moreover, an advantage of small HBOCs including HbV is that they are homogeneously dispersed in the plasma phase and therefore can deliver  $\text{O}_2$  more homogeneously to the periphery than RBCs because microvascular Hct is heterogeneous particularly in pathological states. In such conditions HbV with a higher  $\text{O}_2$  affinity (lower  $P_{50}$ ) should show a slower  $\text{O}_2$  unloading which would be effective for oxygenating ischemic tissues. This result supports the possible utilization of HBOCs with lower  $P_{50}$  for oxygenation of ischemic tissues.

In summary, observation of microcirculation is important for the development of HBOCs because it is the site where oxygen is unloaded to the target tissues. From the international collaborative evaluation studies of HbV, we have clarified the rheological property, advantages of the cellular structure, and the performances of HbV not only as a transfusion alternative but also for oxygen therapeutics.

### Acknowledgements

Our special and sincere gratitude is expressed for Prof. M. Intaglietta (UCSD) who originally introduced us to the field of microcirculation research. We acknowledge Prof. S. Takeoka and Dr. Sou (Waseda Univ.), Prof. Kobayashi and Dr. H. Horinouchi (Keio Univ.), Prof. Suematsu (Keio Univ.), Prof. N. Maeda and Dr. Y. Suzuki (Ehime Univ.) and Dr. Erni (Inselspital Univ. Hospital, Bern) and their colleagues for the continuous collaboration research on HbV. This work was supported in part by Health Sciences Research Grants (Research on Pharmaceutical and Medical Safety, Artificial Blood Project), the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and Grants in Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (B12480268).

### References

- [1] T.M.S. Chang, Hemoglobin based red blood cells substitutes, *Artif. Organs* **28** (2004), 789–794.
- [2] H. Sakai, K. Tomiyama, K. Sou, S. Takeoka and E. Tsuchida, Polyethyleneglycol-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state, *Bioconjugate Chem.* **11** (2000), 425–432.
- [3] E. Frages, R. Grebe and M. Baumann, Viscoelastic and biochemical properties of erythrocyte during storage with SAG-M at +4 degrees C, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **27** (2002), 1–11.
- [4] Y. Suzuki, N. Tateishi, I. Cicha, M. Shiba, M. Muraoka, K. Tadokoro and N. Maeda, Decreased deformability of the X-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **22** (2000), 131–141.
- [5] L. Djordjevich, J. Mayoral, I.F. Miller and A.D. Ivankovich, Cardiorespiratory effects of exchanging transfusions with synthetic erythrocytes in rats, *Crit. Care Med.* **15** (1987), 318–323.
- [6] H. Sakai, S. Takeoka, H. Yokohama, Y. Seino, H. Nishide and E. Tsuchida, Purification of concentrated Hb using organic solvent and heat treatment, *Protein Expression Purif.* **4** (1993), 563–569.
- [7] H. Sakai, K. Hamada, S. Takeoka, H. Nishide and E. Tsuchida, Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes, *Biotechnol. Progress* **12** (1996), 119–125.
- [8] H. Sakai, M. Yuasa, H. Onuma, S. Takeoka and E. Tsuchida, Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types, *Bioconjugate Chem.* **11** (2000), 56–64.
- [9] K. Sou, T. Endo, Y. Naito, S. Takeoka and E. Tsuchida, Efficient up-scale production of hemoglobin-vesicles (HbV) using the freeze-thawing and rapid extrusion, *Biotechnol. Progress* **19** (2003), 1547–1552.
- [10] S. Takeoka, Y. Teramura, T. Atoji and E. Tsuchida, Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction and lipid peroxidation, *Bioconjugate Chem.* **13** (2003), 1302–1308.
- [11] Y. Izumi, H. Sakai, K. Hamada, S. Takeoka, T. Yamahata, R. Kato, H. Nishide, E. Tsuchida and K. Kobayashi, Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension, *Crit. Care Med.* **24** (1996), 1869–1873.
- [12] Y. Izumi, H. Sakai, T. Kose, K. Hamada, S. Takeoka, A. Yoshizu, H. Horinouchi, R. Kato, H. Nishide, E. Tsuchida and K. Kobayashi, Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model, *ASAIO J.* **43** (1997), 289–297.
- [13] H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi and E. Tsuchida, Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats, *Crit. Care Med.* **32** (2004), 539–545.
- [14] A. Yoshizu, R. Izumi, S. Park, H. Sakai, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Ikeda, E. Tsuchida and K. Kobayashi, Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicle, maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor-alpha, *ASAIO J.* **50** (2004), 458–463.

- [15] S. Wakamoto, M. Fujiwara, H. Abe, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Ikeda and K. Ikebuchi, Effects of PEG-modified hemoglobin vesicles on agonist induced platelet aggregation and RANTES release in vitro, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.* **29** (2001), 191–201.
- [16] H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, E. Ikeda, K. Sou, S. Takeoka, M. Suematsu, M. Takaori, K. Kobayashi and E. Tsuchida, Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311** (2004), 874–884.
- [17] K. Sou, R. Klipper, B. Goins, E. Tsuchida and W.T. Phillips, Circulation kinetics and organ distribution of hb-vesicles developed as a red blood cell substitute, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312** (2005), 702–709.
- [18] H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, M. Takaori, K. Kobayashi and E. Tsuchida, Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model, *Biomater.* **25** (2004), 4317–4325.
- [19] H. Sakai, H. Horinouchi, K. Tomiyama, E. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi and E. Tsuchida, Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in metabolism, *Am. J. Pathol.* **159** (2001), 1079–1088.
- [20] H. Sakai, A.G. Tsai, H. Kerger, S.I. Park, S. Takeoka, H. Nishide, E. Tsuchida and M. Intaglietta, Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin, *J. Biomed. Mater. Res.* **40** (1998), 66–78.
- [21] H. Sakai, A.G. Tsai, R.J. Rohlf, H. Hara, S. Takeoka, E. Tsuchida and M. Intaglietta, Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes: Influences of O<sub>2</sub> affinity, *Am. J. Physiol.* **276** (1999), H553–H562.
- [22] Z. Abassi, S. Kotob, F. Pieruzzi, M. Abouassali, H.R. Keiser, J.C. Fratantoni and A.I. Alayash, Effect of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats, *J. Lab. Clin. Med.* **129** (1997), 603–610.
- [23] S.M. Gardiner, A.M. Compton, T. Bennett, R.M.J. Palmer and S. Moncada, Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide, *Hypertension* **15** (1990), 486–492.
- [24] A.G. Tsai, B. Friensenecker, H. Sakai, H. Kerger and M. Intaglietta, Microcirculatory consequences of blood substitution with Hb-vesicles, in: *Blood Substitutes Physiological Basis of Efficacy*, R.M. Winslow, K.D. Vandegriff and M. Intaglietta, eds, Birkhauser, Boston, 1995, pp. 155–174.
- [25] D.H. Doherty, M.P. Doyle, S.R. Curry, R.J. Vali, T.J. Fattor, J.S. Olsen and D.D. Lemon, Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin, *Nat. Biotechnol.* **16** (1998), 672–676.
- [26] S. Moncada, R.M.J. Palmer and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* **43** (1991), 109–131.
- [27] H. Sakai, H. Hara, M. Yuasa, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida and M. Intaglietta, Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension, *Am. J. Physiol.* **279** (2000), H908–H915.
- [28] N. Makino, M. Suematsu, Y. Sugiura, H. Morikawa, S. Shiomi, N. Goda, T. Sano, Y. Nimura, K. Sugimachi and Y. Ishimura, Altered expression of heme oxygenase-1 in the livers of patients with portal hypertensive diseases, *Hepatology* **33** (2001), 32–42.
- [29] N. Goda, K. Suzuki, M. Naito, S. Takeoka, E. Tsuchida, Y. Ishimura, T. Tamatani and M. Suematsu, Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation, *J. Clin. Invest.* **101** (1998), 604–612.
- [30] H. Sakai, Y. Suzuki, M. Kinoshita, S. Takeoka, N. Maeda, and E. Tsuchida, O<sub>2</sub>-Release from Hb-vesicles evaluated using an artificial O<sub>2</sub>-permeable narrow tube: Comparison with RBC and acellular Hb, *Am. J. Physiol.* **285** (2003), H2543–H2551.
- [31] T.C. Page, W.R. Light, C.B. McKay and J.D. Hellums, Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an in vitro capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance, *Microvasc. Res.* **55** (1998), 54–66.
- [32] R.J. Rohlf, E. Bruner, A. Chiu, A. Gonzales, M.L. Gonzales, D. Magde, M.D. Magde, Jr, K.D. Vandegriff and R.M. Winslow, Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide, *J. Biol. Chem.* **273** (1998), 12128–12134.
- [33] D. Erni, R. Wettstein, S. Schramm, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leuning and A. Banic, Normovolemic hemodilution with hemoglobin-vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue, *Am. J. Physiol.* **284** (2003), H1702–H1709.
- [34] C. Contaldo, J. Plock, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leuing, A. Banic and D. Erni, Hemodilution with polymerized and encapsulated hemoglobins improves oxidative energy metabolism in collateralized hamster flap tissue, *Crit. Care Med.* **33** (2005), 806–812.
- [35] H. Sakai, P. Cabrales, A.G. Tsai, E. Tsuchida and M. Intaglietta, Oxygen releasing of Hb-vesicles with different P<sub>50</sub>s from occluded arteriole in hamster skinfold window model, *Am. J. Physiol.* **288** (2005), H2897–H2903.

“人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項(案)”を解説する

Interpretation of a Guidance for Oxygen Carrier Products  
and Their Manufacturing  
Proposed by The Society of Blood Substitutes Japan

高折益彦

Masuhiko Takaori

和文抄録

わが国において開発されたりポソーム小胞体内にヒトヘモグロビン (Hb) を内包させた人工酸素運搬体, すなわち生理食塩液浮遊りポソーム型ヘモグロビンに関する前臨床試験はほぼ完成の域に近ずいてきている。そしてすでに2, 3の企業が次の段階, すなわち工業生産化, 治験第1段階を目指している。このような情勢にかんがみ赤血球代替物として開発される人工酸素運搬体として現時点で付帯すべき安全性, 有効性に関する必要条件を明確にしておくことは重要課題である。そのため日本血液代替物学会は“人工酸素運搬体作製に関する留意事項”としてその原案を提示した。本稿においてはこの留意事項の各項について, それらが持つ意義, 必要性について検討を加えた。さらにその工業生産工程での留意事項, ならびにその過程における倫理上の問題点についても検討した。さらにこのような人工酸素運搬体の初期段階での臨床使用, たとえば希釈式自己血輸血 (体外循環使用をふくむ), 病院の内外での急性出血処置への応用についても論及した。

Abstract

Preclinical tests for liposome encapsulated hemoglobin as a new oxygen carrier are being almost completed. Some companies have intended to carry it on manufacturing system and then to design its phase I clinical trial in the near future. Accordingly it is necessary and useful at the present time that safety and efficacy of artificial oxygen carrier as an erythrocyte substitute should be defined and also its manufacturing process should be proposed from scientific and ethical view point. Recently “The Society of Blood Substitutes, Japan” presented a guidance for its requiring properties and manufacturing system. This review introduced the guidance and attempted to interpret in its details, such as physicochemical and biological properties of the liposome-encapsulated hemoglobin, evaluation for influence on vital functions in experimental subjects after its administration, establishment of consistent processing and qualifying system. This review looked over further clinical use, such as hemodilutional autologous blood transfusion or treatment for unexpected, massive bleeding, of artificial oxygen carriers at the first step.

Keywords

guidance, artificial oxygen carrier, manufacturing system, ethics, clinical application, qualification, property

はじめに

少子高齢化にともなう献血志望者の減少, さらに新たな輸血感染症の出現等により最近では輸血用血液の供給に障害をきたすようになってきている。この深刻な問題はひとりわが国の問題だけではなく, ひろく全世界共通の問題にもなっている。このような情勢に対して人工酸素運搬体を速やかに開発, 臨床

応用に導くことはひとりわが国の医療体制への貢献のみならず全人類への福音でもある。むしろ赤血球に代わる人工酸素運搬体の開発のみが上記の問題すべての解決とはならない。しかし赤血球の利用が献血される血液成分の中でもっとも高いことを考慮すれば, 人工酸素運搬体の開発の重要性は明かである。

すでに前世紀初頭から人工酸素運搬体開発は進められてきて

いる。そしてようやくこの数年間に臨床使用に耐えうるような人工酸素運搬体の出現を見るに到った。とくにわが国においてはリポソーム小胞体内にヒトヘモグロビン (Hb) を内包した人工酸素運搬体、すなわち細胞型 (cellular type) 人工酸素運搬体の開発が進められ、前臨床試験の段階ではほぼ完成の域に近づいてきている。そしてすでに2, 3の企業が次の段階、すなわち工業生産化、治験第1段階を目指している。このような情勢にかんがみ臨床使用を目的とした人工酸素運搬体として付帯すべき条件を明確にしておくことは重要であると考えられる。人工酸素運搬体の安全性、有効性に関する必要条件等について米国を中心にすでにいくつかの提案がなされている<sup>12) 13) 14)</sup>。そこで今回、日本血液代替物学会は社会からの一般的な理解が得られ、諸企業がその開発、生産を容易ならしめるための人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項 (以下、留意事項) を提案することになった (Table 1, 別紙p.110)。本稿においては今回提示された留意事項の各項が持つ意義、必要性などを述べ、ついでそれらについての検討を加えることとした。

## 1. 開発の対象となる人工酸素運搬体

過去にも種々の物質、加工物が人工酸素運搬体として用いられないかと研究されてきた。そしてすでに臨床試験にまで到達したもの<sup>15)</sup>もあった。そしてこれらはただ単に輸血用赤血球の代替としてだけでなく、組織の超酸素化、呼吸不全の治療などと種々の臨床応用にも考えられていた<sup>16)</sup>。しかし今回、提示された留意事項での人工酸素運搬体は生体の血管系を循環し、組織に酸素を運搬、供給して組織の酸素代謝を改善、維持する機能を有するものを対象としている。すなわち少なくとも現段階での開発対象は出血に対する治療で赤血球輸血に代わるものとしている。したがって以下に述べる人工酸素運搬体の性質、臨床応用などもすべてこの目的に適合するものとしている。ただしわが国で現在開発されている人工酸素運搬体はヒトヘモグロビン (Hb) をリポソームに内包させたりリポソーム型Hbを酸素運搬体としている。そしてそれを生理食塩液中に浮遊させたものである。もし将来、リポソーム型Hb以外の酸素運搬体を使用する、あるいは生理食塩液以外の溶媒 (たとえば人工膠質液: hydroxyethyl starch液) を使用する場合には別途そのための“留意事項”を作製することが必要となる。

## 2. 製品の物理的、化学的、生物学的性質

製品としてはリポソーム型Hb粒子が溶媒内に均一に分布していることが望まれる。もし保存中に溶媒内に沈殿しているような場合、臨床使用の場における攪拌操作にて完全な均一化が得られる保証がない。したがって製造時から、そして保存時にもリポソーム型Hb粒子の溶媒内での均一分散が保たれていることが要求される。また循環血液中、すなわち流動状態においてもリポソーム型Hb粒子同士が集合、凝集することなく、各粒子が血液中、少なくとも大・中血管内では均一に分布していることが望まれる。

リポソーム型Hb粒子がすべての血管系を循環するためには

管腔径がもっとも狭い毛細血管系を通過しなければならない。かりにも同部を通過することができず、その部において閉塞をきたすことがあってはならない。赤血球は変形能を有するゆえに直径2-3  $\mu\text{m}$ の管腔を通過することができる。しかしリポソーム型Hb粒子には変形能はなく、いわば剛体である。そのため少なくとも粒子直径が1  $\mu\text{m}$ 以下でないと毛細血管系を通過できない。またその際に生理的な灌流圧で通過しうることも必要である。

製品を血液中に投与した場合、血液の粘度に大きな変化をあたえることは好ましくない。すなわち赤血球に凝集、集合を発生させて血液粘度を上昇させることも<sup>17)</sup>、また逆に血液希釈、血漿の粘度低下により血液粘度を低下させることも好ましくない<sup>18) 19)</sup>。後述するごとく、実際の臨床使用ではその使用量に制限が加えられる。このような状態下では生体の血液と混合されるためリポソーム型Hb液の粘度値の範囲が比較的大きくても生体の血液粘度に大きな変化をきたすことがない。とはいえ臨床使用時にその高粘度のために注入速度が低下したり、加圧注入を必要とすることはあってはならない。したがって製品そのものの粘度も生理的な血液粘度に近い2.0-5.0 cps (50-100/sec $\cdot$ 37 $^{\circ}\text{C}$ ) であることが望ましい。

またリポソーム型Hb粒子を血管内に投与した際には必ず周囲の血液成分、血管内皮細胞と接触する。そして異物として認識されて網内系細胞に貪食される<sup>20)</sup>。さらに細胞間質にリポソーム型Hbの構成成分が再度放出されて組織貯留をきたす可能性もある<sup>21)</sup>。このような組織、細胞との接触の過程においてリポソーム型Hb自身の変性、あるいはそれら組織、細胞に変性、あるいはそれらの機能に障害をあたえてはならない。またそれらとの接触によりそれらの組織細胞から、活性酸素などのフリーラジカル、生物学的メディエーターなどを遊離させることにより、临床上問題となるような生体反応を発生せしめないことが望まれる。この場合フリーラジカル、生物学的メディエーターなどの遊離は絶対に生じないという保証はない。しかしそれが临床上問題となるようなことがなければ受け入れられよう。

人工酸素運搬体としてのリポソーム型Hb粒子の機能性、すなわち有効性について第一に望まれることは組織への酸素の運搬、供給能力である。すなわちそれが生体の肺毛細血管内を想定した環境下、すなわち血液温度が37 $^{\circ}\text{C}$ 、pHが7.35-7.45、酸素分圧が100-200 mmHgで製品の100 mlが10 ml以上の酸素と結合し、末梢で酸素分圧が40 mmHg以下の微小循環血管内からその結合酸素の25%以上を放出することが望ましい。一般貧血患者での赤血球輸血を開始する基準は生体の血液中Hb値が6 g/dl (酸素含有量=8.6 ml/dl) となっている<sup>22)</sup>。したがってこの限界酸素量以上の酸素を運搬することが望まれる。そのため9 ml/dlを最低限界とすることも考えられる。一方、末梢組織での赤血球、あるいは人工酸素運搬体からの酸素放出は生理的条件により異なり、さらに高比率に放出する可能性がある。すなわち末梢組織で嫌気性代謝を起こさない限界静脈内酸素分圧を7.2 $\pm$ 1.5 mmHg<sup>23)</sup> とするならば上記酸素含有量はさらに少なくとも許されることになる。しかし有効性、安全性を考慮



すれば上記の基準を適応するのが妥当であろう。

またリポソームに内包されるHbの酸素親和度、 $P_{50}$ の選択についても同様のことが考えられる。このような人工酸素運搬体を使用する症例では一般に酸素吸入の適応となっている。したがって $P_{50}$ が比較的高いHbを使用しても肺における酸素化は十分におこなわれる。そして末梢における酸素放出効率が大きくなる。一方 $P_{50}$ が比較的低いHbを使用しても上記の末梢組織における限界静脈内酸素分圧以上であれば十分量の酸素放出が行なわれる。ただ $P_{50}$ が高い、すなわち酸素放出が容易なHbを使用した場合には毛細血管レベル以前の細動脈レベルにて比較的大量の酸素を放出し、そのため細動脈の収縮をきたし、毛細血管血流量の減少をきたす可能性がある<sup>15)</sup>。一方 $P_{50}$ が低いHbを使用する場合にはこのような可能性が少なくなる。さらに酸素吸入ができない状況下でも、また肺における血液酸素化機能が低下したような場合でもHbの酸素化が行なえる。

Hbを利用した人工酸素運搬体ではHbのメトヘモグロビン(methemoglobin: metHb)への変化(メト化)の問題は重要問題である。一般に十分に酸素化された状態ではHbは次第にメトヘモグロビンに移行し、酸素運搬能力を消失する。生体の赤血球内metHbは赤血球細胞内の還元酵素の作用により再びHbに還元される。人工酸素運搬体としてのリポソームHb内にこの還元酵素を含有させることは技術的に種々の制限をうける。また封入し得たとしても次第に劣化してその機能を失う。このメト化速度は周囲の酸素分圧、温度に影響される。そこでリポソームHbが人工酸素運搬体として用いられるためには、想定される血液中条件、すなわち100-200 mmHgの酸素分圧、37℃の温度下でその変化速度(半減期)が少なくとも12時間以上であることが望まれる。さもないと後述する生体内に投与した場合のリポソーム粒子の血液内消失速度と同様に実地臨床での利用価値が低下することとなる(実地臨床での人工酸素運搬体使用とその機能の項参照)。

### 3. 製品の安定性、純度

前項、製品の物理的、化学的、生物学的性質において述べた人工酸素運搬体の性質には室温、あるいは一般保冷库温度下において少なくとも1年間は変化しない安定性が望まれる。製品の開発目的の一つは製品を特殊な保管条件下でなく、室内、または一般保冷库内に常時保管し、必要に応じて直ちに使用できることにある。また使用期限を過ぎた献血血液を有効利用することも人工酸素運搬体に課せられた任務でもあるので、有効使用期間が短いものであってはならない。そのためには製品の性質、機能が少なくとも1年間は変化しないことが望まれる。

製品は中核となるHb、それを内包するリン脂質、さらにリポソーム型Hb粒子の分散性を維持するポリエチレングリコールなど製造過程において数多くの原材料を必要とする。そして最終製造段階にこれらの原材料物質が残存している場合にはこれを可及的除去して製品化する。しかし完全にリポソーム型Hbのみを取り出すことは不可能である。すなわちこれらの残存不純物質の存在は避けられない。しかしそれが生体に毒性を、

また生体機能に影響を与えない程度の濃度に抑えることは必要で、それに適合した基準を設けることは必要である。

製品は薬剤である。したがってその無菌性、発熱性は日本薬局方に準拠した無菌試験法、エンドトキシン試験法にて確認することが必須である。

以上の性格・機能性、安全性、安定性、純度などはすべてin vitroにて検証することが可能である。次の段階、すなわち生体(細胞、組織、動物など)での試験(in vivo試験)前に必ず施行、確認しておくべき事項である。

### 4. 生体投与にともなう機能性、安全性

人工酸素運搬体を作製する目的は臨床での使用である。治験第一段階、第二段階ではヒトを対象として検討される。しかしその前に前臨床試験として生物体を対象としてとして製造された人工酸素運搬体の安全性、機能性を検討しておかなければならない。

試験対象として初期段階では遊離細胞、培養組織をはじめ、小動物(マウス、ラット等)を用いて検討を行なっても、次段階では中動物、大動物で検討を行なわなければならない。さらに機能性、毒性の一部については霊長類を使用して検討することが必要である。また各動物種について統計学的に有意差が得られる動物数にて検討されなければならない。

また開発新薬の安全性確認のための毒性試験として単回投与、ならびに反復投与を行なうことが規定されている。実際の臨床の場では人工酸素運搬体を1-2 ml/kg・minの注入速度で投与するのが限界と思われる。したがって前臨床試験ではその2-3倍の速度、すなわち3-5 ml/kg・minの速度で注入して安全性を確かめておくことが望ましい。臨床の場においては出血に対する処置として人工酸素運搬体を投与するため、その失血量に応じて等量、もしくは1.2-1.3倍量を投与することとなる。しかし前臨床試験で単純投与(top loading)する場合には10-20 ml/kgが限界となろう。このような負荷試験は臨床での過剰投与時での安全性確認としてあっても良いと思われる。しかしもしこれ以上の量を投与することは血液量増加を負荷することとなり、リポソーム型Hbそれ自身の毒性以外の障害を生体にあたえることとなる。したがってさらに大量の投与を試みる場合には血液交換にて施行すべきである。すなわち生体の一定量の血液を廃棄し、同量のリポソーム型Hb液を投与する方式を採用すべきである。さらにまたその血液交換量が多くなる場合(20 ml/kg以上)にはリポソーム型Hb液になんらかの膠質液の添加が必要である。注入されたりポソーム型Hbは直ちに血管内から消失しないが、溶媒である生理食塩液は速やかに血管外に移行し、循環血漿量、ひいては循環血液量の減少をきたし、循環不全に陥る可能性がある。また逆に10 ml/kg程度の量でも連日投与すればリポソームの血管内滞留が生じ、そのために血液量の増加、血液粘度の上昇から循環不全をきたす可能性もある。反復投与での毒性試験の際にも十分な投与期間をおいた投与方法、たとえば10-20 ml/kg・weekの3-4回投与、あるいは0.2-0.4 ml/kg・dayの14日間連続投与などの投与方法を

選択すべきと考える。

生体機能への影響、毒性に関する検査・観察項目はこのリポソーム型Hbの特性を考慮するとともに、一般的な新薬開発での検定事項をふまえて留意事項(案)、Table 1.(別紙p.111)の5. 3)に示される20項目などでの検討が望まれる。

生体内での人工酸素運搬体の機能として、投与されたりポソーム型Hbが肺にて酸素と結合、その一部を末梢微小循環系で放出し、組織の酸素代謝を改善、あるいは維持することが大命題である。その放出率、あるいは組織の酸素摂取率は各組織、臓器によって異なるが、現在開発対象となっているリポソーム型HbのようにHbを酸素運搬物質とするかぎり、前述の末梢組織で嫌気性代謝を起こさない限界静脈内酸素分圧<sup>14)</sup>以上の酸素放出は可能である。

生体の網内系は投与されたりポソーム型Hb粒子を異物と認識してそれらを貪食する。そのため血液中のリポソーム型Hb粒子は次第に減少し、ラットに20 ml/kg量を投与した場合でも一週間後にはリポソーム型Hb粒子が血液中に認められなくなる<sup>15)</sup>。すなわちラットでのその減少率は半減期として16-18hr<sup>12)16)</sup>と報告されている。このデータをビトのそれに演繹した場合、この半減期は30 hr以上となると予想される<sup>17)</sup>。これは後述する臨床での人工酸素運搬体の使用、応用面で期待される半減期の12 hr以上を越えることとなり、現在のリポソーム型Hbは人工酸素運搬体として十分にその機能をはたすことになる。

## 5. 製造工程、品質管理

前臨床試験にて確実、かつムラのないデータを得るためには製品の均一性が常に得られていることが不可欠である。むしろ臨床にて使用する製品にはこのことがきびしく要求される。そのためには一貫性のある製造工程を確立していることと同時に製品の品質管理システムが確立されていることが必須である。むしろ製品への病原体、有害物質などの混入があってはならない。そのためには厳密に管理された環境下で製造されなければならない。この面でも上記の一貫性ある製造工程は有効であり必要である。さらに製品の品質を検定、確認する機構を確立しておくことが必要である。すなわち製造された製品は各ロット毎に検定されなければならない。

## 6. 倫理的配慮

製品の原料となるHbはヒト血液由来のものである。したがって製品の製造に携わる施設には原材料、ならびに製品の取り扱いが倫理的に適切に行なわれているか、またそれに携わる職員の倫理教育が十分行なわれているか、監視し、指導・教育する倫理委員会を組織することが必要である。また動物実験をふくめた基礎的研究においても国、ならびに当該施設が定めた管理規定に準拠して施行しなければならない。この指導、監視をふくめて倫理委員会は活動しなければならない。

## 7. 実地臨床での人工酸素運搬体使用とその機能

人工酸素運搬体の開発にあたり、その人工酸素運搬体が臨床

でどのように利用されるかあらかじめ想定しておくことが必要である。冒頭に述べたごとく人工酸素運搬体開発の目的は献血から得られた輸血用血液の有効利用、そして長期保存、随時使用可能な赤血球代替物の作製である。赤血球輸血を完全に代替する人工酸素運搬体の開発は最終目的ではあるが、そこに到達するにはあまりにも多くの、そして困難な問題を残している。まず投与されたりポソーム型Hb粒子の循環血液内滞留時間、Hbのメト化阻止などの問題である。とはいえ人工酸素運搬体の開発への社会的期待は大きく、かつ性急である。そのためわが国での現状をふまえてTable 2.に示すような臨床応用を当面の目的とすることを提案したい。すでにTable 2.における1)、2)への応用は他の人工酸素運搬体を用いて臨床で行なわれている<sup>7)18)</sup>。そして血液の酸素運搬機能を限られた期間でも人工酸素運搬体で代替するならば、生体自身の赤血球新生機能による循環赤血球量の回復が生じ<sup>19)20)</sup>、同種血輸血を回避、あるいは節減することが可能となる。さらにTable 2.の3)への応用は蘇生輸液としての意義が大きく、とくに医療機関外(out of hospital)でパラメディカルによる使用に期待がかけられる。しかしこのような目的への人工酸素運搬体の使用についてあらかじめ二つの前提条件を設定しておくべきではないかと考える。

その一つはこの人工酸素運搬体の実地臨床使用量である。すなわちリポソーム型Hbを生理食塩水に浮遊させた製品では全く膠質浸透圧を有しない。したがって出血に対して血液の補いとして上記のリポソーム型Hb液を注入した場合、血漿量、すなわち血液量の維持はきわめて短時間にとどまる。そのため現在までの多くの基礎研究施行時にはアルブミン液をリポソーム型Hb液に併用している。むしろ臨床使用時にも膠質液、アルブミンの併用が必要となろう。しかし医療経済的な面からはアルブミン液に代わり人工膠質液を使用することが推奨されるが人工膠質液の使用量には生体の止血機能への影響を考慮して一般的に20-30 ml/kgとする制限がある。またたとえアルブミン液を使用すとしても凝固因子の希釈からほぼ同等の使用量が制限量となるであろう<sup>21)</sup>。したがって人工酸素運搬体(リポソーム型Hb)の使用量は一般的に20-30 ml/kgにとどまるものと思われる。

Table 2.

### Clinical Application of Artificial Oxygen Carrier at the First Step

- 1) Replacement fluid for normovolemic hemodilution
- 2) Priming solution of cardiopulmonary bypass circuit
- 3) Alternative red blood cell transfusion for acute, massive bleeding before arrival of matched blood

第二にこのような赤血球代替物の投与後の作用、有効時間の問題である。少なくともリポソーム型Hbは一定時間、酸素運搬体として赤血球に代わる作用をはたすことは確実である。しかしその他の赤血球機能は兼備していない。また異物として作用することも明かである。したがって赤血球と同等に長く循環

血液中に滞留することはむしろ望まれない。Pageら<sup>23)</sup>は人工酸素運搬体は6時間程度の酸素運搬機能を発揮すれば臨床的には十分ではないかと述べている。さりとて血液、とりわけ赤血球の代替物として一般臨床の場において、災害時、あるいは辺境の地での医療活動において使用されることを考慮すれば、少なくとも12時間程度はその機能を維持することが望まれるのではなかろうか。

おわりに

以上、臨床使用に適した人工酸素運搬体の作製、製造について、その化学的、物理的、そして生物学的必要条件、とくにそのin vitro, in vivoでの安全性、機能性の面からの検討方法などについて述べてきた。そしてこれらをふまえてその製造工程、ならびに一般的な倫理的配慮の重要性についても考察した。人工酸素運搬体の性状、機能に対して要求される条件は追求すれば尽きるところがない。また開発に関する付帯事項、製造工程についての規制事項も厳密に考慮すれば限りがなく、実施面での対応は非常に困難となる。そのため臨床使用の時期に遅れを生じる。しかし人工酸素運搬体の開発、製造は今やわが国の医療、社会にとって差し迫った重要問題である。そのため現時点で製造できる製品の安全性、機能性を明確に把握し、それに適合させた臨床応用の範囲内でまず実用化すべきと考える。そして将来新たな技術が開発され、さらに優れた人工酸素運搬体が得られた時点ではその臨床使用の範囲を拡大すべきと考える。

この人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項(案)の作製には厚生労働省科学研究(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)＝人工赤血球の安全性向上に関する研究＝研究事業の補助研究費の支援により行なわれた。そして本論文の要旨は第12回日本血液代替物学会において発表された。なおこの論文の作製にあたり新薬作製、製造に関する規制事項をふくめ多大のご教授、ご助言をいただいたバイオアクセラレーター株式会社の小澤健夫氏に心からの感謝を捧げる。

## 引用文献

1. Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider in the safety evaluation of hemoglobin-based oxygen carriers. *Transfusion* 1991;31:369-371.
2. Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider on efficacy evaluation of hemoglobin- and perfluorocarbon-based oxygen carriers. *Transfusion* 1994;34:712-713.
3. Przybelski RL, Daily EK, Stern KN, Mattia Goldberg, C. A graded scale for assessment of safety of blood substitutes. *Transfusion* 1997;37:749-751.
4. Fratantoni JC. Red cell substitutes : Evolution of approaches for demonstrating efficacy In : Blood

- Substitutes - Present and Future Perspectives Tsuchida, E. ed. Amsterdam Elsevier Sci. 1998;33-39.
5. 高折益彦. 人工血液としての条件—liposome-encapsulated hemoglobinの有効性, 安全性への検討. *人工血液* 2002; 10:28-35.
  6. Spahn DR, van Bremp R, Theilmeier G, Reibold J-P, Welte M, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. *Anesthesiology* 1999;91:1195-1208.
  7. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, Rodman G. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock : A randomized controlled efficacy trial. *JAMA* 1999;282:1857-1864.
  8. Agishi T, Ikeda Y, Iwashita Y, Kobayashi K, Kouro K, Matsushita M, Motoki R, Sekiguchi S, Taira A, Takaori M. and ed. Tsuchida, E. Safety and efficacy of red cell substitutes In *Artificial Red Cells : Materials, Performances and Clinical Study as Blood Substitutes* Ed. Tsuchida, E. John Wiley & Son, Chichester 1995;239-257.
  9. 高折益彦. 粘度 (viscosity) と赤血球集合 (erythrocyte aggregation) In : 代用血漿剤と臨床 高折益彦編著 東京 克誠堂 : 2004;24-37.
  10. Mazzoni MC, Tsai AG, Intaglietta M. Blood and plasma viscosity and microvascular function in hemodilution - A perspective from La Jolla California *Eur Surg Res* 2002; 34:101-105.
  11. Tsai AG, Acero C, Nance PR, Cabrales P, Frangos JA, Buerk DG, Intaglietta M. Elevated plasma viscosity in extreme hemodilution increases perivascular nitric oxide concentration and microvascular perfusion. *Am J Physiol* 2005;288:H1730-H1739.
  12. Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, Ikeda E, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E. Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials* 2004;25:4317-4325.
  13. Stehling LC, Doherty DC, Faust RJ, Greenburg AG, Harrison DF, Landers DF, Laros RK, Pierce EC, Prust RS, Rosenberg AD et al. Practice guidelines for blood component therapy : A report by the Am Soc Anesthesiologists Task Force on Blood Component Therapy. *Anesthesiology* 1996;84:732-747.
  14. Richmond KN, Shonat RD, Lynch RM, Johnson PC. Critical PO<sub>2</sub> of skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* 1999;277: H1831-H1840.
  15. Sakai H, Tsai AG, Rohlfes RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitute : Influence of

- O-2 affinity. *Am J Physiol* 1999;45:H553-H562.
16. Tsutsui Y, Kimura T, Ishizuka T, Oomoto S, Shizawa T, Goto H, Ogata Y, Kaneda S. Duration of efficacy NRC (Neo Red Cell) in a rat hemodilution model. *人工血液* 2002;10:36-41.
  17. Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:702-709.
  18. Greenburg AG, Kim HW. Use of an oxygen therapeutic as an adjunct to intraoperative autologous donation to reduce transfusion requirements in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Am Coll Surgeons* 2004;198:373-383.
  19. Takaori M, Safar P, Galla SJ. Changes in body fluid compartments during hemodilution with hydroxyethyl starch and dextran 40. *Arch Surg* 1970;100:263-268.
  20. 中山雅人, 小川重男, 高折益彦. 拡大血液希釈性自己輸血に関する研究. *日本輸血学会雑誌* 1984;30:168-174.
  21. Johnson SD, Lucas CE, Gerrick SJ, Ledgerwood AM, Jiggins RF. Altered coagulation after albumin supplements for treatment of oligemic shock. *Arch Surg* 1979;114:379-383.
  22. Pape A, Kleen M, Kemming G, Meisnerr F, Meier J, Habler O. Fluid resuscitation from severe hemorrhagic shock using diaspirin cross-linked hemoglobin fails to improve pancreatic and renal perfusion. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:1328-1337.

## Human plasma protein modified to bind oxygen reversibly

# Albumin engineered for artificial blood

A modified version of human serum albumin (HSA) that binds oxygen has been created by British and Japanese researchers. The work marks a first step towards a new form of artificial blood.

HSA is the most abundant plasma protein in human blood. It naturally binds with haem, an iron-containing porphyrin group that is a central component of haemoglobin, to produce a complex that can be oxidised. Chemists and structural biologists from Waseda University, Tokyo, and Imperial College London have developed a version of this HSA-haem complex that can reversibly bind oxygen, rather than react with it.

After studying the crystal structure of the complex, the researchers experimented with different versions produced by introducing modified plasmids into the yeast *Pichia pastoris*. Replacing a specific tyrosine residue in the HSA-haem complex with a



**Artificial blood based on HSA-haem will not induce high blood pressure**

hydrophobic amino acid such as leucine or phenylalanine and introducing histidine as a proximal base led to effective oxygen binding. This modified complex could

reversibly bind oxygen with an affinity only one order of magnitude less than that of haemoglobin.

Previous candidates for artificial blood are based on haemoglobin and liable to induce high blood pressure. This would not happen with an artificial blood based on the HSA-haem complex, say the researchers, because of an electrostatic repulsion between HSA and blood vessel walls.

Much work remains, admits Stephen Curry, reader in structural biology at Imperial. 'The lifetime of oxygen binding at the HSA-haem complex is still too short for practical use,' he told *Chemistry World*. 'At present we are trying to engineer additional mutations in the protein in order to enhance the oxygen binding properties still further.'

*Jon Evans*

**Reference**

T Komatsu *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15933

## 人工酸素運搬体 実証プラント建設 ニプロが20ℓ規模

ニプロはナノカプセル型人工酸素運搬体「ヘモグロビン小胞体」の実証プラントを12月中に建設する。共同研究を行うオキシエニクス（東京都港区、高木智史社長、0

3・5733・1683）の京都研究所（京都市下京区）内に20ℓ規模の設備を建設する。投資額は3億円。血液型照合が不要で大量使用できる救急救命用酸素輸液として臨床試験を行い、段階的に量産化を進める。

ニプロは早稲田大学、慶応義塾大学による「ヘモグロビン小胞体」共同開発プロジェクトに02年から加わり、事業化を進めてきた。これまでに動物実験で安全性を確認、生産技術にめどがついたことから実証プラントを設けることにした。07年7月には同設備で生産した製品を使い、第1相臨床試験に入る。

さらに08年には第2

相臨床試験に向け、60ℓ70ℓ規模のプラントを子会社のニプロファーマ大館工場（秋田県大館市）内に建設する計画。投資額は約20億円。

ヘモグロビン小胞体は、粒径約250ナノ

（1ナノは10億分の1）と人の赤血球の約30分の1の大きさで、100cc中10％の濃度でヘモグロビンを内包する。救急用の酸素輸液や心筋梗塞など、血管が詰まる虚血性疾患の酸素供給治療剤としても活用が期待されている。

常温で2年間保存できることから、備蓄用としても使える。

原料には献血後、使われなかった血液の提供を受けて使用する。加熱殺菌とナノフィルターの2段階で血中のウイルスの不活化と除去を行う。熱に弱いヘモグロビンに酸化炭素を付加することで、60度Cの高温で10時間加熱できるように工夫し、安全性を高めた。



# 大学発ベンチャーの挑戦

オキシシエンクスは早稲田大学理工学部と慶応義塾大学医学部の研究技術シーズを事業化した。オ・ペンチャー。外科手術など輸血時に投与して血中のガス交換を行うセル型酸素輸液「Oxy Gen Carrier」(オキシシエンキアリブ)を開発中だ。

土田英俊早稲田大学名誉教授ら4人が技術顧問兼創業者に名を運ぶ。

技術的な特徴の一つは熱に弱いヘモグロビンに一酸化炭素を付加し、高温処理を可能にした点に利用が期待される。

同キヤリアは脱酸素化などの製剤技術で長期間の室温保存や輸送ができて、赤血球の約30分の1と小さな血管狭窄部でも通過できる性質を生かす。

開発中の酸素輸液「オキシシエンキアリブ」

## 献血血液で酸素輸液

### 早慶のシーズ事業化

救急救急時や外科手術時の酸素輸液として、実用化できると見た高木智史社長が、両大学の共同研究成果に基づき設立。

主材料のヘモグロビンは日本赤十字社から提供を受けたり期限切れ献血血液が原料。開発中の同キヤリアは、リン脂質2分子膜リポソームで構成され、粒径は約250ナノメートルだ。

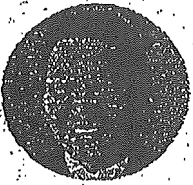
ナノフィルター処理も行うことでウイルス不活化・除毒を行い、安全性をより高めている。

主要拠点は3カ所。京都研究所(京都市下京区)、横浜市鶴見区製剤技術開発を担当。横浜研究所(横浜市鶴見区)は小動物や細胞を用いて生物学的評価を行う。基礎研究センター(東京都新宿区)は基礎研究からパイプライン構築を目標としている。

現在、京都研究所内に約4億円を投じてGMP(医薬品の製造管理および品質管理規則)治験薬製造設備を建設中だ。非臨床試験と臨床試験で使用する酸素輸液を製造する予定で、近く第一相臨床試験入りする。「カリ

▽本社 東京都港区、03・5733・1688  
▽社長 高木智史氏  
設立 02年12月  
資本金 17億9629万9000円  
従業員 45人

## オキシシエンクス



高木智史社長

高木智史社長

