

Figure 4 Distribution of pO_2 in the microvessel of the microcirculation of the hamster window preparation as a function of the arteriolar order of branching (As) and the venular order of branching (Vs). It is apparent that tissue pO_2 is narrowly regulated to a value in the range of 22 to 24 mmHg, which is significantly higher than the level associated with anaerobic metabolism.

the same variability is present, there is a significant amount of tissue that is anoxic. In the presence of a fraction of the oxygen-carrying capacity that can only be released at very low pO_2 s, a form of targeted oxygen delivery, the effects of this variability will be nullified, ensuring that all the tissue, even at low pO_2 is oxygenated above the anaerobic threshold.

Tissue pO_2 levels that may be considered harmful could, in fact, be quite safe if it were possible to eliminate the inherent variability of oxygen delivery shown by the variability of tissue pO_2 . A small quantity of a low- $p50$ hemoglobin oxygen carrier in the circulation accomplishes this because it delivers oxygen only to portions of the tissue where the anoxic threshold is passed, while the presence of even significant amounts of right-shifted hemoglobin would have no effect since most of the bound oxygen would be unloaded in oxygenated regions.

Cross-linked or polymerized hemoglobins developed so far have a high $p50$, presumed to be beneficial since it facilitates oxygen unloading. However, pO_2 in the microcirculation is regulated so that there is a significant decrease in oxygen tension from the systemic circulation to the capillaries, which typically have a pO_2 of about 30 mmHg. At this $p50$ half of the blood oxygen is delivered by arterioles in normal conditions; however, if the $p50$ of the OCPEs is above this value, as in the case of Oxyglobin ($p50 = 54$ mmHg), most of the oxygen in the blood should be delivered by the arterioles if this material were to replace blood. These vessels extract a significant amount of oxygen from the circulation while consuming a major portion of this oxygen flux, thus increasing their oxygen supply increases tissue oxygen inhomogeneity, which is further aggravated by the vasoconstrictor autoregulatory response already discussed.

Oxygen-Carrying Capacity

Measurements of pO_2 in the microcirculation utilizing the technique of phosphorescence oxygen quenching show that when hemodilution carried out to a total hemoglobin content in red blood cells of 5.6 g/dL, then tissue oxygen is somewhat higher than normal but not statistically significant. The required oxygen-carrying capacity can also be obtained by a simple calculation that relates the whole-body oxygen consumption and cardiac output, which yields a nearly identical number for the organism at rest. Therefore, in principle, the oxygen-carrying capacity of an OCPE does not need to reproduce the value for normal blood and can be significantly lower.

Colloid Osmotic Pressure

It is generally assumed that a blood substitute should have a colloid osmotic pressure similar to that of blood and in the range of 20 to 25 mmHg; however, several plasma expanders have zero colloid osmotic pressure (saline, Ringer's lactate) and small-volume resuscitation utilizes fluids with very high osmotic properties. To date there is no definitive answer on what is the osmotic and/or oncotic property that is most appropriate, and in all probability this is a variable that depends on the type of blood loss to be corrected. Resuscitation with noncolloidal fluids leads to tissue edema. Conversely fluids with high colloidal and osmotic pressures cause tissue fluid to come into the vascular compartment, thus decreasing the amount of fluid to be administered. Most conditions of hemorrhage are associated with endothelial edema, which has been demonstrated to be rapidly reversed upon the introduction of hyperosmotic and hyperoncotic fluids. Volume expansion fluids such as hydroxyethyl starch have relative high colloid osmotic pressures, typically in the range of 30 to 50 mmHg depending on formulation. Small molecule hemoglobin-based OCPEs have their oncotic pressure adjusted to be that of plasma, but PEG-hemoglobin modified OCPEs tend to have higher oncotic pressures.

Synthesis of an Effective Oxygen-Carrying Plasma Expander

An OCPE based on the preceding concepts is a fluid with properties fundamentally different from those of blood, since it has low oxygen-carrying capacity, $p50$ is low and in the neighborhood of 5 mmHg, viscogenic properties are such that when introduced into the circulation plasma viscosity should be of the order of 2.0 to 2.5 cP, and colloidal osmotic pressure can be high. A fluid with these properties can be obtained by conjugating hemoglobin with PEG, and various formulations have been tested in both animal experiments and human trials with excellent results. Notably this

formulation is vasoinactive, and its NO-scavenging characteristics do not appear to be relevant since these fluids have the same NO binding constant as other vasoactive formulations that are vasoactive [7].

These fluids are in some cases more effective than blood because they are designed to maintain FCD, which is as necessary as restoring tissue oxygenation for the recovery from blood losses. Because in the foreseeable future OCPEs will use human hemoglobin, these fluids are practical: Their hemoglobin content is low, and more than two units of blood equivalent unit of resuscitation fluid can be obtained from one unit of blood. Finally, this low oxygen-carrying capacity is practical and safe because it yields a significant improvement of microvascular function.

Experimental Evidence

The effectiveness of different resuscitation modalities was tested experimentally in studies of extreme hemodilution and hemorrhagic shock in the microcirculation of the hamster chamber window model, which allows microcirculatory monitoring in the awake condition for a period up to 1 week, after the effects of the surgical intervention have subsided. Extreme hemodilution was chosen because in most instances, lowering systemic hematocrit to 50 percent of baseline with a suitable plasma expander does not alter microvascular hemodynamics and transport in our experimental model. Animals were hemodiluted to 60 percent of normal with dextran 70 kDa, and further hemodiluted to a final hematocrit of 11 percent using the different products simulating blood losses initially remedied with conventional plasma expanders, which upon passing the transfusion trigger are corrected with an oxygen-carrying blood substitute.

A compendium of findings in extreme hemodilution to 50 percent of normal with dextran 70kDa and further hemodilution to a final hematocrit of 11 percent with the different products is shown in Figure 5, including results obtained with PEG-Hb vesicles developed at Waseda University, Tokyo, using a somewhat different protocol where extreme hemodilution was achieved with a continuous exchange of a hemoglobin vesicle suspension. FCD is shown as a function of blood base excess, which represents systemic conditions and suggests the definition of *critical functional capillary density* as the value for this parameter at which base excess is no longer sustained and drops following modest reductions of total blood hemoglobin, that is, in the neighborhood of a 50 percent FCD reduction. The most important result is that normal base excess is obtained with total blood hemoglobin of 5 percent, if 1 percent of this is Mal-PEG-Hb—a result not found with other OCPEs.

Extreme hemodilution is not a clinically relevant procedure and serves only to study basic mechanisms. A clinically relevant test is to rescue a subject in hemorrhagic shock. Studies were therefore conducted to determine the effects of resuscitation with blood, starch, and Mal-PEG-Hb in a con-

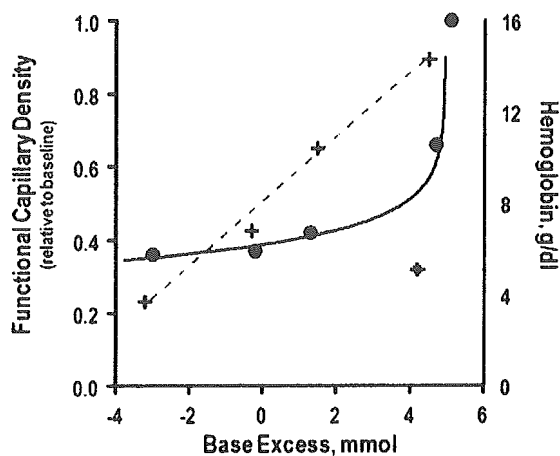


Figure 5 Relationship between total circulating hemoglobin and base excess, and FCD and base excess, for different hemoglobin modifications and concentrations, including hemoglobin vesicles, in normovolemic hemodilution experiments. The data marked ● shows the relationship between FCD and base excess, showing that MAL-Peg-Hb (▼) yields high FCD and base excess at low hemoglobin concentrations. It is apparent that base excess is a direct function of hemoglobin concentration (+) with the exception of MAL-Peg-Hb (◆), which presents normal base excess at a very low total hemoglobin content. (see color insert)

ventional 50 percent bleed shock protocol. The animals were resuscitated after 1 hour without any additional volume manipulation using shed blood, HES, and Mal-PEG-Hb with 25 percent of the blood volume. The results, shown in Figure 6, indicate that Mal-PEG-Hb is superior to both HES and blood in reestablishing microvascular function. Concurrently it was found that base excess was higher in the Mal-PEG hemoglobin-resuscitated animals than in the blood-resuscitated animals. An explanation for these findings is that low p50 hemoglobin targets oxygen delivery of oxygen to only the anoxic tissue.

An extreme hemorrhage study was performed with Mal-PEG-Hb in which rats were 50 percent exchange transfused before hemorrhage with either $\alpha\alpha$ -cross-linked hemoglobin, or 4 percent Mal-PEG hemoglobin (Figure 7). These animals were then subjected to a continuous exponential bleed (1 hour, 60 percent of blood volume) whereby at the end of the second hour after the start of bleeding 50 percent of the control animals succumbed. In these experiments it was found that at the end of one hour all animals that received Mal-PEG hemoglobin before hemorrhage survived, while all of those receiving $\alpha\alpha$ -cross-linked hemoglobin did not survive.

Summary and Conclusions

The revision of microvascular physiology related to modifying basic transport properties of blood such as plasma viscosity, p50, and hemoglobin concentration shows

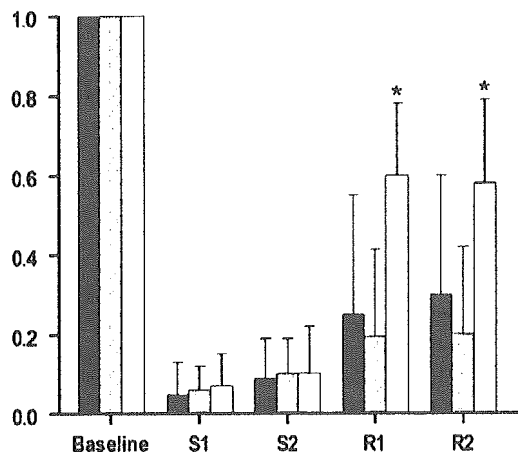


Figure 6 Recovery of FCD during resuscitation from 1 hour hemorrhagic shock with identical volumes of shed blood (black bars), 5 percent HES (shaded bars), and 4 percent MAL-Peg-Hb (white bars). S1 and S2 initial and final conditions during the shock period. R1, Recovery immediately after resuscitation; R2, 1 hour after resuscitation. $p < 0.05$ relative to shed blood and HES.

that blood or a bloodlike fluid may not be the optimal oxygen-carrying volume-restoring fluid. A critical parameter for either oxygen-carrying or noncarrying blood replacements is their viscosity, which is a factor in maintaining capillary flow.

Analysis of the microvascular consequences of changing blood rheological conditions and particularly plasma shows that low plasma viscosity is not of universal benefit. Patients following trauma, peripheral arterial occlusive disease, and acute myocardial infarction have elevated plasma viscosity, a condition presumed to be pathological. However, there are situations where increased viscosity may be a protective or beneficial mechanism.

Plasma expanders are not used after reaching the transfusion trigger because the reduction of blood oxygen-carrying capacity beyond this point is assumed to jeopardize tissue oxygenation, according to the systemic evaluation of the organism portrayed by blood gases. Conditions in the microcirculation and local microscopic tissue environment when the reduction of red blood cells is extended beyond the transfusion trigger have not been consistently explored and presently show that oxygen-carrying capacity is not the major factor in determining tissue survival.

Studies show that the transfusion trigger is also the limit for the organism to adapt to low blood viscosity in acute conditions; thus *the conventional transfusion trigger is also a viscosity trigger*. Since the administration of a molecular oxygen carrier is physically similar to continuing fluid therapy after reaching the transfusion trigger, the maintenance of FCD requires the increase of plasma viscosity which through shear stress-dependent mechanisms operating in the endothelium ensures the maintenance of optimal

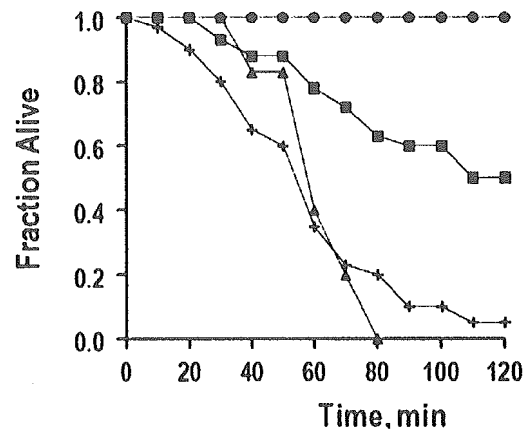


Figure 7 Controlled bleeding in rats that are 50 percent exchange transfused with MAL-Peg-Hb (●), $\alpha\alpha$ -cross-linked hemoglobin (▲), and a polymerized hemoglobin (+), versus controls (■) with no treatment. The study was designed so that 50 percent of the untreated (not transfused controls) would survive 120 minutes.

microvascular function. Oxygen-carrying capacity is exhausted upon red blood cell (or hemoglobin) losses that are significantly greater than those represented by the transfusion trigger. However, these losses of oxygen-carrying capacity do not need to be compensated on a one-to-one basis, if microvascular function (i.e., FCD) is maintained and an oxygen carrier is introduced only to deliver oxygen to anoxic tissue regions. This approach ensures a uniform maintenance of the whole organism above the anaerobic threshold, while limiting the amount of oxygen carrier needed to maintain metabolism. Thus the combination of maintenance of microvascular function and targeted oxygen delivery is the primary determinant of an efficacious human hemoglobin-based blood substitute that is more effective than blood in acute conditions and that also expands the available blood supply, since a unit of blood yields more than two units of surrogate blood.

Glossary

Functional capillary density: Number of capillaries in a unit volume of tissue that presents the passage of red blood cells. This parameter is experimentally determined by measuring the length of red blood cell-perfused capillaries in a microscopic field of view.

Microvascular function: A combination of parameter including flow, number of open capillaries, intact vascular permeability, and level of vessels tone that allows for the proper interaction between blood and tissue at the microscopic level.

Oxygen-carrying capacity: The amount of oxygen in milliliters at standard atmospheric conditions and temperature contained in a fluid.

p50: Partial pressure of oxygen at which hemoglobin is 50 percent saturated with oxygen.

Plasma expander: A fluid used to restore circulatory volume when oxygen-carrying capacity is adequate.

Transfusion trigger: Level of blood hemoglobin at which the decision is made to introduce red blood cells into the circulation in order to restore oxygen-carrying capacity.

Vasoactivity: Inherent property of compounds that cause vasoconstriction and the elevation of systemic blood pressure.

Acknowledgments

This work was supported by Bioengineering Research Partnership grant R24-HL64395 and grants R01-HL62354 and R01-HL62318 to M.I.

References

1. Kerger, H., Saltzman, D. J., Menger, M. D., Messmer, K., and Intaglietta, M. (1996). Systemic and subcutaneous microvascular pO_2 dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am. J. Physiol.* **270**, H827–H836. Reports the basic data showing the direct correlation between survival and maintenance of functional capillary density.
2. Tsai, A. G., Friesenecker, B., McCarthy, M., Sakai, H., and Intaglietta, M. (1998). Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skin fold model. *Am. J. Physiol.* **275**, H2170–H2180. Experimental demonstration that high viscosity plasma in extreme hemodilution maintains microvascular function and systemic conditions, an effect that is not present at an identical reduction of hematocrit (oxygen-carrying capacity) when plasma viscosity is normal.
3. Smiesko, V., and Johnson, P. C. (1993). The arterial lumen is controlled by flow-related shear stress. *News Physiol. Sci.*, 34–38.
4. Cabrales, P., Tsai, A. G., and Intaglietta, M. (2004). Microvascular pressure and functional capillary density in extreme hemodilution with low and high plasma viscosity expanders. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H363–H373. Experimental demonstration that capillary blood pressure and functional capillary density are directly related. In extreme hemodilution increased plasma viscosity elevates capillary pressure at reduced overall oxygen delivery. By comparison, hemodilution to the same hematocrit, but increased blood hemoglobin following the introduction of a low-viscosity vasoactive hemoglobin solution, lowers capillary pressure and FCD.
5. Sakai, H., Hara, H., Yuasa, M., Tsai, A. G., Takeoka, S., Tsuchida E., and Intaglietta, M. (2000). Molecular dimensions of Hb-based O_2 carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am. J. Physiol.* **279**, H908–H915.
6. Manjula, B. N., Tsai, A. G., Intaglietta, M., Ho, C., Malavalli, A., Vandegriff, K., Winslow, R. M., Friedman, J. M., Smith, P. K., and Acharya, S. A. (2003). Thiolation mediated, maleimide-chemistry based pegylation of Hba: Design, preparation and characterization of (PEG5K)6-hba, a new non-hypertensive Hb-based oxygen carrier. *Bioconjug. Chem.* 2003.
7. Rohlf, R. J., Brunner, E., Chiu, A., Gonzales, A., Gonzales, M. L., Magde, D., Magde, M. D., Jr., Vandegriff, K. D., and Winslow, R. M. (1998). Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **273**, 12128–12134. Direct demonstration that vasoactivity and the induction of hypertension are not dependent on NO scavenging, since hemoglobin solutions with the same NO binding capacity cause a range of responses, varying from no effect on blood pressure found with pegylated hemoglobin to a maximal increase in blood pressure found with $\alpha\alpha$ -hemoglobin.
8. McCarthy, M. R., Vandegriff, K. D., and Winslow, R. M. (2001). The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobins: Implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophys. Chem.* **92**, 103–117.

Further Reading

- Kobayashi, K. (2004). *Artificial Oxygen Carrier: Its Frontline*, Vol. 12. Tokyo: Springer-Verlag.
- Rudolph, A. S., Rabinovich, R., and Feurestein, G. Z. (1998). *Red Blood Cell Substitutes. Basic Principles and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker.
- Tsuchida, E. (1998). *Blood Substitutes: Present and Future Perspectives*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Winslow, R. M., Vandegriff, K. D., and Intaglietta, M. (1995). *Blood Substitutes. Physiological Basis of Efficacy*. Boston: Birkhäuser.
- Winslow, R. M., Vandegriff, K. D., and Intaglietta, M. (1996). *Blood Substitutes. New Challenges*. Boston: Birkhäuser.
- Winslow, R. M., Vandegriff, K. D., and Intaglietta, M. (1997). *Advances in Blood Substitutes. Industrial Opportunities and Medical Challenges*. Boston: Birkhäuser.

Biographies

Amy G. Tsai obtained her Ph.D. in bioengineering at the University of California, San Diego, where she is currently a Senior Research Scientist. She is widely recognized for her findings on oxygen consumption by the microvasculature and the development of high-viscosity plasma expanders. She is an expert in mathematical modeling, measuring methods for the in vivo study of the microcirculation and small animal experimentation.

Dr. Pedro Cabrales received his Ph.D. from the Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, studying the microvascular effects of extreme hemodilution with perfluorocarbons. He specializes in hemodynamic transport phenomena, having developed techniques for the analysis of tissue oxygenation at the microscopic level. He is presently at the Laboratory of Microhemodynamics of the University of California, San Diego.

Dr. Hiromi Sakai received his Ph.D. in polymer chemistry from Waseda University, Tokyo, Japan, where he is now Associate Professor. He specialized in the synthesis and characterization of oxygen carriers from the viewpoint of molecular assembly. For several years he was a visiting scholar at the University of California, San Diego, where he developed expertise in microhemodynamics. He is currently working on the optimization of oxygen carriers using in vivo methods in order to determine their safety and efficacy.

Prof. Marcos Intaglietta received his Ph.D. in applied mechanics from the California Institute of Technology in Pasadena and developed his academic career at the University of California, San Diego, where he is one of the founders of the bioengineering program and department. His specialty is the study of transport phenomena in the microcirculation and the development of blood substitutes. He has developed and implemented most of the methods presently used for the study of the microcirculation.

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 O₂ 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 O₂ 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 O₂ 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 O₂ 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.

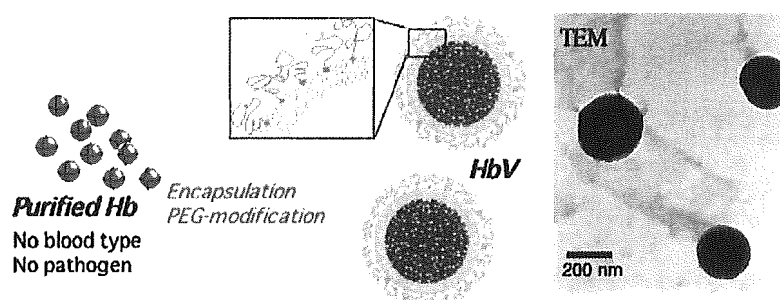


Fig. 1. Hemoglobin-vesicles (HbV) encapsulate the ultrapurified and concentrated human Hb solution (35 g/dl) with phospholipid bilayer membrane, and the surface is modified with polyethylene glycol chains. The well-regulated particle size (about 250 nm) was confirmed by TEM. One particle contains about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

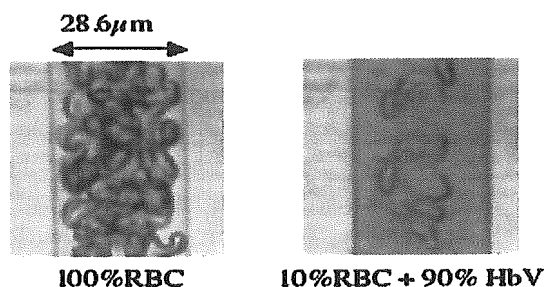


Fig. 2. Flow patterns of RBCs mixed with HbVs suspended in human serum albumin in a narrow tube (diameter, $28.6\ \mu\text{m}$) [30]. RBCs tended to flow in the centerline, while the HbV particles were homogeneously dispersed in a suspension medium. The individual particles could not be seen at this 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 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 O_2 transport. It has been suggested that the faster O_2 unloading from the HBOCs is advantageous for tissue oxygenation [31]. However, this concept is controversial regarding the recent findings since an excess 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 O_2 releasing rate similar to RBC as confirmed in this study.

One characteristic of HbV is that the 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 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 HbV₈ and HbV₂₉, respectively), and observed their O_2 releasing behavior from an occluded arteriole in a hamster skinfold window model [35]. Conscious hamsters received HbV₈ or HbV₂₉ 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 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 $p\text{O}_2$ (50–52 mmHg) decreased to about 5 mmHg for all the groups. Occlusion after HbV₈ infusion showed slightly slower rate of $p\text{O}_2$ reduction in comparison with that after HbV₂₉ infusion. The arteriolar O_2 content was calculated at each reducing $p\text{O}_2$ in combination with the O_2 equilibrium curves of HbVs, and it was clarified that HbV₈ showed significantly slower rate of O_2 release in comparison with HbV₂₉ and was a primary source of 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 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 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 O_2 affinity (lower P_{50}) should show a slower 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 H₂O₂ 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 O₂ 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 hemoglobin, 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 O₂ 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, O₂-Release from Hb-vesicles evaluated using an artificial O₂-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. Leunig 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 P₅₀s 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

Interpretion of a Guidance for Oxygen Carrier Products and Their Manufacturing Proposed by The Scociety 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リ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 Scociety 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。もちろん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ボ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¹¹⁾²¹⁾³¹⁾⁴¹⁾⁵¹⁾。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⁶¹⁾⁷¹⁾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はなく、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⁸¹⁾。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) をリボソームに内包させたりボソーム型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、リボソーム型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

製品としてはリボソーム型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ボソーム型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ボソーム型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。

リボソーム型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 μm の管腔を通過することができる。しかしリボソーム型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 μm 以下でない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⁹¹⁾、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¹⁰¹⁾¹¹¹⁾。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ボソーム型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。

またリボソーム型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¹²¹⁾。さらに細胞間質にリボソーム型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¹²¹⁾。このような組織、細胞との接触の過程においてリボソーム型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、臨床上的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。しかしそれが臨床上的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ボソーム型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¹³¹⁾。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 mmHg¹⁴¹⁾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。

またリボ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¹⁵⁾。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ボソーム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。そこでリボソーム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ボ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することにある。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、さらにリボソーム型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に除去して製品化する。しかし完全にリボソーム型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。実際の臨床の間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。臨床の間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、リボソーム型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、同量のリボソーム型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)にはリボソーム型Hb液になんらかの膠質液の添加することが必要である。注入されたりボソーム型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ボ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・観察項目はこのリボソーム型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、投与されたりボソーム型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ボソーム型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¹⁴⁾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ボソーム型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ボソーム型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ボソーム型Hb粒子が血液中に認められなくなる¹²⁾。すなわちラットでのその減少率は半減期として16-18hr¹²⁾¹⁶⁾と報告されている。このデータをヒ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¹⁷⁾。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、現在のリボソーム型Hbは人工酸素運搬体として十分にその機能を果たすことになる。

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。まず投与されたりボソーム型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⁷⁾¹⁸⁾。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¹⁹⁾²⁰⁾、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。すなわちリボソーム型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ボソーム型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ボソーム型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はほぼ同等の使用量が制限量となるであろう²¹⁾。したがって人工酸素運搬体(リボソーム型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。少なくともリボソーム型Hbは一定時間、酸素運搬体として赤血球に代わる作用を果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²²⁾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

- Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider in the safety evaluation of hemoglobin-based oxygen carriers. *Transfusion* 1991;31:369-371.
- Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider on efficacy evaluation of hemoglobin- and perfluorocarbon-based oxygen carriers. *Transfusion* 1994;34:712-713.
- Przybelski RL, Daily EK, Stern KN, Mattia Goldberg, C. A graded scale for assessment of safety of blood substitutes. *Transfusion* 1997;37:749-751.
- 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.
- 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.
- Spahn DR, van Breet 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Richmond KN, Shonat RD, Lynch RM, Johnson PC. Critical PO₂ of skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* 1999;277: H1831-H1840.
- Sakai H, Tsai AG, Rohlf 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.

読売新聞

発行所
読売新聞東京本社
第45919号

〒100-8055
東京都千代田区大手町1-7-1
電話 (03)3242-1111(代)
<http://www.yomiuri.co.jp/>

2004年(平成16年)1月25日 日曜日

感染不安ない人工血液

早・慶大など開発 2年後実用化目指す

血液中に含まれるたんぱく質の一つ、アルブミンに酸素を運ぶ能力を持たせた「人工血液」を早稲田大、慶応大、熊本大などのグル

ープが開発した。大量生産と長期保存が可能で、ウイルス感染や血液型不適合の心配のない安全な輸血に道を開くと期待されている。グループは動物実験で効果を確認しており、二年後の実用化を目指す。

酸素は、赤血球に含まれるヘモグロビンというたんぱく質に結合し体内組織へ運ばれる。米国ではヘモグロビンを加工した人工血液が作られたが、血圧上昇などの副作用があり、人への使用は認可されていない。

土田英俊・早大名誉教授らのグループは、血圧を維持し、様々な物質を体内に運ぶ役割を持つアルブミンに着目。ヘモグロビンと同様に、鉄を中心を持つヘムという分子を組み入れたア

ルブミンヘムを作り、肺で酸素を吸収し、体内の組織で放出する機能を持たせることに成功した。

赤血球より小さいので、血栓のできた部分にも酸素を供給でき、脳こうそくなどの治療に使える可能性もある。アルブミンを遺伝子組み換えで作る手法を日本の医薬品会社が開発して臨床試験を終えており、アルブミンヘムの量産にもめどが立っているという。

研究グループの小林絃一・慶応大教授は「室温で長く保存でき、いつでも使える。献血不足を解消できるだろう」と話している。

感染血液「すり抜け」なぜ?

速さ・安全 どう両立

日赤の高感度検査施設に見る

献血された血液はまず各地の血液センターでウイルス感染の証拠を示す抗原・抗体の有無が調べられる。しかし、これだけでは抗体がでないごく直近の感染を見逃すため、NAT施設でウイルスそのものが血液中に含まれていないかどうかを確認する。対象はB型肝炎、C型肝炎、エイズ(HIV)の各ウイルスで、NATも「合格」した血液だけが、輸血などに使

まとめて50人分⇒20人分に
1人当たりの検体量増やす

●「限界」の中、対策●



NATに使用される核酸抽出装置―東京都大田区の日赤中央血液センターの核酸増幅検査部で、いずれも山下 写す

ウイルス感染した献血者の血液が、日本赤十字社が安全性確保の「切り札」としている高感度の核酸増幅検査(NAT)をすり抜けてしまう事例があることが問題となっている。昨年末には、検査をすり抜けた血液を輸血された患者がエイズウイルス(HIV)に2次感染したことも明らかになった。日赤のNAT施設を訪れ、検査の実態と「限界」がなぜあるのかを探った。

【江口 二】



献血された血液の一部をNATに送るため、キャップをした検体―東京都大田区の日赤中央血液センターで

用できる仕組みだ。

全国3カ所のNAT施設のうち、全体の約60%に当たる日赤中央血液センターの核酸増幅検査部を訪れた。白衣を着替え、靴の裏の付着物を粘着質のマットで取り除き、施設内に入った。

同センターに集められた検査用血液(検体)は抗原・抗体検査をパスし

た後、NAT施設でウイルスそのものが血液中に含まれていないかどうかを確認する。対象はB型肝炎、C型肝炎、エイズ(HIV)の各ウイルスで、NATも「合格」した血液だけが、輸血などに使

用できる仕組みだ。全国3カ所のNAT施設のうち、全体の約60%に当たる日赤中央血液センターの核酸増幅検査部を訪れた。白衣を着替え、靴の裏の付着物を粘着質のマットで取り除き、施設内に入った。

同センターに集められた検査用血液(検体)は抗原・抗体検査をパスし

た後、NAT施設でウイルスそのものが血液中に含まれていないかどうかを確認する。対象はB型肝炎、C型肝炎、エイズ(HIV)の各ウイルスで、NATも「合格」した血液だけが、輸血などに使

用できる仕組みだ。全国3カ所のNAT施設のうち、全体の約60%に当たる日赤中央血液センターの核酸増幅検査部を訪れた。白衣を着替え、靴の裏の付着物を粘着質のマットで取り除き、施設内に入った。

同センターに集められた検査用血液(検体)は抗原・抗体検査をパスし

た後、NAT施設でウイルスそのものが血液中に含まれていないかどうかを確認する。対象はB型肝炎、C型肝炎、エイズ(HIV)の各ウイルスで、NATも「合格」した血液だけが、輸血などに使

用できる仕組みだ。全国3カ所のNAT施設のうち、全体の約60%に当たる日赤中央血液センターの核酸増幅検査部を訪れた。白衣を着替え、靴の裏の付着物を粘着質のマットで取り除き、施設内に入った。

同センターに集められた検査用血液(検体)は抗原・抗体検査をパスし

た後、NAT施設でウイルスそのものが血液中に含まれていないかどうかを確認する。対象はB型肝炎、C型肝炎、エイズ(HIV)の各ウイルスで、NATも「合格」した血液だけが、輸血などに使

用できる仕組みだ。全国3カ所のNAT施設のうち、全体の約60%に当たる日赤中央血液センターの核酸増幅検査部を訪れた。白衣を着替え、靴の裏の付着物を粘着質のマットで取り除き、施設内に入った。

同センターに集められた検査用血液(検体)は抗原・抗体検査をパスし

た後、NAT施設でウイルスそのものが血液中に含まれていないかどうかを確認する。対象はB型肝炎、C型肝炎、エイズ(HIV)の各ウイルスで、NATも「合格」した血液だけが、輸血などに使

用できる仕組みだ。全国3カ所のNAT施設のうち、全体の約60%に当たる日赤中央血液センターの核酸増幅検査部を訪れた。白衣を着替え、靴の裏の付着物を粘着質のマットで取り除き、施設内に入った。

同センターに集められた検査用血液(検体)は抗原・抗体検査をパスし

たかどかかをコンピュータで確認した後、一人一人検体から0.1mlずつ抽出し、50人分まとめて一つの「フル検体」とする。これは機械4台による作業だ。「血液が飛び散った」というと、ウイルス汚染で施設全体が使用不能になる恐れがある(同センター)ため、わざわざ機械の速度をあげることはできない。1時間で1700人分の処理が限界だという。

血小板の保存期限は72時間

フル検体を核酸抽出装置に入れてウイルスの核酸(DNAまたはRNA)を取り出し、試験でその一部を2時間半かけて約1億倍に増幅する。その結果、わずかでもウ

イルスがあることが検出され、感染と分かる。日間、C型肝炎で同23日間、HIVで同11日間の検出は難しいとされる。検体にウイルスが含まれないほど、感染者のウイルスが微量だと、見つめるのは不可能だ。木村部長も「全力を尽くしているが、NATだけでは限界があるのも事実」と認める。日赤によると、NATで99年から今年2月末までにウイルス感染を見つけたのは、検査した24万3563人のうち54人分だった。

日赤は「すり抜け」問題を重視し、今後はフル検体の人数を50人から20人に減らし、1人当たりの検体の血液量を増やすことで、より微量のウイルスでも検出できるようにする方針だ。

また、心筋どうぞやと、血圧や血中酸素濃度が回復し、赤血球に代わって働いていることが確かめられた。血液のたんぱく質、アルブミンに薬を運ばせる、新しいタイプの分子合成にも成功した。

小林教授によると、人工赤血球は「使う人の血液型を選ぶ」感染性の危険がなく、長く保存できる一利がある。保存は半年以上可能だ。本物は必要になる災害現場などに活用できる」とあて

【元村 有希子】

まず、赤血球 実用化の期待 ● 研究進む人工血液

■「型」を選ばない

■感染症心配なし

■長く保存できる

早稲田大の土田英俊名誉教授は80年代、慶応大の小林敏一教授と共同で、酸素が結合するヘモグロビンを脂質の膜で二重に包んだ「ヘモグロビン小胞体」を考案した。血液の半分を抜いたら

たかどかかをコンピュータで確認した後、一人一人検体から0.1mlずつ抽出し、50人分まとめて一つの「フル検体」とする。これは機械4台による作業だ。「血液が飛び散った」というと、ウイルス汚染で施設全体が使用不能になる恐れがある(同センター)ため、わざわざ機械の速度をあげることはできない。1時間で1700人分の処理が限界だという。

血小板の保存期限は72時間

フル検体を核酸抽出装置に入れてウイルスの核酸(DNAまたはRNA)を取り出し、試験でその一部を2時間半かけて約1億倍に増幅する。その結果、わずかでもウ

イルスがあることが検出され、感染と分かる。日間、C型肝炎で同23日間、HIVで同11日間の検出は難しいとされる。検体にウイルスが含まれないほど、感染者のウイルスが微量だと、見つめるのは不可能だ。木村部長も「全力を尽くしているが、NATだけでは限界があるのも事実」と認める。日赤によると、NATで99年から今年2月末までにウイルス感染を見つけたのは、検査した24万3563人のうち54人分だった。

日赤は「すり抜け」問題を重視し、今後はフル検体の人数を50人から20人に減らし、1人当たりの検体の血液量を増やすことで、より微量のウイルスでも検出できるようにする方針だ。

また、心筋どうぞやと、血圧や血中酸素濃度が回復し、赤血球に代わって働いていることが確かめられた。血液のたんぱく質、アルブミンに薬を運ばせる、新しいタイプの分子合成にも成功した。

小林教授によると、人工赤血球は「使う人の血液型を選ぶ」感染性の危険がなく、長く保存できる一利がある。保存は半年以上可能だ。本物は必要になる災害現場などに活用できる」とあて

【元村 有希子】

まず、赤血球 実用化の期待 ● 研究進む人工血液

■「型」を選ばない

■感染症心配なし

■長く保存できる

早稲田大の土田英俊名誉教授は80年代、慶応大の小林敏一教授と共同で、酸素が結合するヘモグロビンを脂質の膜で二重に包んだ「ヘモグロビン小胞体」を考案した。血液の半分を抜いたら

たかどかかをコンピュータで確認した後、一人一人検体から0.1mlずつ抽出し、50人分まとめて一つの「フル検体」とする。これは機械4台による作業だ。「血液が飛び散った」というと、ウイルス汚染で施設全体が使用不能になる恐れがある(同センター)ため、わざわざ機械の速度をあげることはできない。1時間で1700人分の処理が限界だという。

血小板の保存期限は72時間

フル検体を核酸抽出装置に入れてウイルスの核酸(DNAまたはRNA)を取り出し、試験でその一部を2時間半かけて約1億倍に増幅する。その結果、わずかでもウ

イルスがあることが検出され、感染と分かる。日間、C型肝炎で同23日間、HIVで同11日間の検出は難しいとされる。検体にウイルスが含まれないほど、感染者のウイルスが微量だと、見つめるのは不可能だ。木村部長も「全力を尽くしているが、NATだけでは限界があるのも事実」と認める。日赤によると、NATで99年から今年2月末までにウイルス感染を見つけたのは、検査した24万3563人のうち54人分だった。

日赤は「すり抜け」問題を重視し、今後はフル検体の人数を50人から20人に減らし、1人当たりの検体の血液量を増やすことで、より微量のウイルスでも検出できるようにする方針だ。

また、心筋どうぞやと、血圧や血中酸素濃度が回復し、赤血球に代わって働いていることが確かめられた。血液のたんぱく質、アルブミンに薬を運ばせる、新しいタイプの分子合成にも成功した。

小林教授によると、人工赤血球は「使う人の血液型を選ぶ」感染性の危険がなく、長く保存できる一利がある。保存は半年以上可能だ。本物は必要になる災害現場などに活用できる」とあて

【元村 有希子】

まず、赤血球 実用化の期待 ● 研究進む人工血液

■「型」を選ばない

また、心筋どうぞやと、血圧や血中酸素濃度が回復し、赤血球に代わって働いていることが確かめられた。血液のたんぱく質、アルブミンに薬を運ばせる、新しいタイプの分子合成にも成功した。

小林教授によると、人工赤血球は「使う人の血液型を選ぶ」感染性の危険がなく、長く保存できる一利がある。保存は半年以上可能だ。本物は必要になる災害現場などに活用できる」とあて

【元村 有希子】

まず、赤血球 実用化の期待 ● 研究進む人工血液

■「型」を選ばない

■感染症心配なし

■長く保存できる

早稲田大の土田英俊名誉教授は80年代、慶応大の小林敏一教授と共同で、酸素が結合するヘモグロビンを脂質の膜で二重に包んだ「ヘモグロビン小胞体」を考案した。血液の半分を抜いたら

たかどかかをコンピュータで確認した後、一人一人検体から0.1mlずつ抽出し、50人分まとめて一つの「フル検体」とする。これは機械4台による作業だ。「血液が飛び散った」というと、ウイルス汚染で施設全体が使用不能になる恐れがある(同センター)ため、わざわざ機械の速度をあげることはできない。1時間で1700人分の処理が限界だという。

血小板の保存期限は72時間

フル検体を核酸抽出装置に入れてウイルスの核酸(DNAまたはRNA)を取り出し、試験でその一部を2時間半かけて約1億倍に増幅する。その結果、わずかでもウ

イルスがあることが検出され、感染と分かる。日間、C型肝炎で同23日間、HIVで同11日間の検出は難しいとされる。検体にウイルスが含まれないほど、感染者のウイルスが微量だと、見つめるのは不可能だ。木村部長も「全力を尽くしているが、NATだけでは限界があるのも事実」と認める。日赤によると、NATで99年から今年2月末までにウイルス感染を見つけたのは、検査した24万3563人のうち54人分だった。

日赤は「すり抜け」問題を重視し、今後はフル検体の人数を50人から20人に減らし、1人当たりの検体の血液量を増やすことで、より微量のウイルスでも検出できるようにする方針だ。

また、心筋どうぞやと、血圧や血中酸素濃度が回復し、赤血球に代わって働いていることが確かめられた。血液のたんぱく質、アルブミンに薬を運ばせる、新しいタイプの分子合成にも成功した。

小林教授によると、人工赤血球は「使う人の血液型を選ぶ」感染性の危険がなく、長く保存できる一利がある。保存は半年以上可能だ。本物は必要になる災害現場などに活用できる」とあて

【元村 有希子】

まず、赤血球 実用化の期待 ● 研究進む人工血液

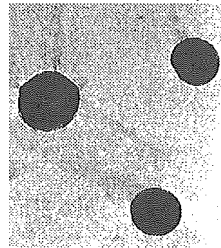
■「型」を選ばない

人工赤血球を量産

ニプロなど、安定供給に道

医療品メーカーのニプロとベンチャー企業のオキシジェニクス(東京・港)、早稲田大学、慶応義塾大学の研究グループは、長期保存できる人工赤血球Ⅱ写真Ⅱの量産技術を開発することに成功した。人工赤血球は血液型によらず輸血できるとされ、災害対策用医療品として備蓄することに道を開く一歩。専門学会の評価を踏まえた上で臨床試験を目指す。

開発したのは二社のほか、早大の土田英俊名誉教授、武岡真司・助教授、慶大医学部の小林絃一教授と末松誠教授の研究グループ。厚生労働省の支援を受けて取り組んだ。人工赤血球の大きさは、直径二百五十ナノ(ナノは十億分の一)で、毛細血管もつまずかずに通る。一つの人工赤血球には三万個のヘモグロビンが含まれ、脂質の膜で包んだ構造になっている。膜表面には高分子を取り付けてあり、人工赤血球同士がくっつき凝固するのを防いだ。ヘモグロビンは廃棄処分となるヒトの赤血球から抽出したものを有効利用する。研究グループはヘモグロビンの量や、脂質を混ぜ合わせる際の温度などを調整して、膜中のヘモグロビン濃度が九・九%以上の人工赤血球を量産する技術を確認。形状も一様で、安定供給できるといふ。



サルを使った実験段階

では安全性に問題は認められなかった。今後、日本血液代替物学会に評価を依頼、結果を踏まえた上で二〇〇六年にも臨床試験を始める。

人工赤血球は厚生省や経済産業省が後押しして長年研究が続けられてきた。だが、ヘモグロビンの濃度が高く品質の安定した人工赤血球を量産するのが難しかった。赤血球が凝固する課題もあり、欧米でも実用化され

ていない。

研究チームは二〇一〇年まで臨床試験を続け、二〇一二年の販売を目指す。

卷之四
 四
 五
 六
 七
 八
 九
 十
 十一
 十二
 十三
 十四
 十五
 十六
 十七
 十八
 十九
 二十
 二十一
 二十二
 二十三
 二十四
 二十五
 二十六
 二十七
 二十八
 二十九
 三十
 三十一
 三十二
 三十三
 三十四
 三十五
 三十六
 三十七
 三十八
 三十九
 四十
 四十一
 四十二
 四十三
 四十四
 四十五
 四十六
 四十七
 四十八
 四十九
 五十
 五十一
 五十二
 五十三
 五十四
 五十五
 五十六
 五十七
 五十八
 五十九
 六十
 六十一
 六十二
 六十三
 六十四
 六十五
 六十六
 六十七
 六十八
 六十九
 七十
 七十一
 七十二
 七十三
 七十四
 七十五
 七十六
 七十七
 七十八
 七十九
 八十
 八十一
 八十二
 八十三
 八十四
 八十五
 八十六
 八十七
 八十八
 八十九
 九十
 九十一
 九十二
 九十三
 九十四
 九十五
 九十六
 九十七
 九十八
 九十九
 一百

21世紀の
鏡

赤血球に代わり体内でだ人工赤血球の開発に取り組んだ。

研究がよいよ臨床試験へ進もうとしている。「よい発見が人生を変えた。ナノテクノロジー（超微約二十年間、研究を続け細技術）」という言葉もま

てきた早稲田大学助教の武岡真司(41)は感慨深く振り返る。

人工赤血球研究臨床へ

研究に携わったのは学部生時代から。それまでの講義や実験に満足できなかった武岡は指導が厳しいと評判だった早大教授、土田英後の研究室に進んだ。

実験好き。少年時代は押し入れの実験室で好奇心を満たしていた自他共に認める「変な子だった」。土田研究室でヘモグロビンを脂質でくるんから注目された。しかしこれが大きなブレッシャーとなる。半年以上、同じ球体を作れなかった。何がいけないのか理由が分からない。

「これから調べるしかない」。意を決して温度や分子の重合度など二十三十ある生成条件を一つずつ調節し始めた。

「た」と武岡は振り返る。研究室の方針で人工赤血球の研究から三年ほど離れ、博士号を取得してから再び担当に復帰、チームに発破をかける

二年ほどかかったが、チームリーダーとなった。修士課程一年の終わりにだがその研究チームは以て自在に分子や穴の大きさを変えて生成するノウハウを築き上げた。

研究臨床へ

ハウを蓄えた。二の経験が大きな自信になつた。企業との共同研究が頓挫するなど、研究が進まなかつた。研究チームの雰囲気も暗い。実験がうまくいかなかった。自信を持って開発した

一つ一つ積み上げ成果

早稻田大学助教授

武岡 真司氏

（たけおか・しんじ）一九六三年生まれ、東京都出身。九一年早稲田大学理工学
研究科修了、同学部助手。九三年専任講師、
九六年より現職。九八―九九年、ベンシルペ
ニア大学の客員研究員兼務。

酸素を運搬する機能のある血液の代替物で、血液型によらず輸血できる。多数のヘモグロビンに脂質の膜で覆はれた構造。直徑約二百五十ナノメートルは十億分の一）がと小さいため、毛細血管でも詰まらずに通る。一つの人工赤血球には三万個のヘモグロビンが含まれる。膜表面には高ヒンが取り付けてあり、人工赤血球同士がくっつき凝固するのを

人工赤血球

血液型によらず輸血可能

を防いでいる。

厚生労働省などの支援を受けて、異年により研究されてきたが、長期の混入やヘモグロビンの濃度などに問題があり、安定した品質で量産するのが難しくなった。南アフリカやロシアでは牛のヘモグロビンなどを使った、製品の実用化も始まっており、米国でも臨床試験の最終段階に入っている。

果

人工赤血球だが簡単に、約一カ月も異物が混じら生物に使えなかった。初めての動物実験では注射した途端に酸だつた。論文にもない量産作業に「これ死んでしまった。衝撃は研究じゃない」と学生のおまり体がストライキを起こした。最もつらい時期だった。押し入れの実験室で好感を感じた。

からは動物実験などの成果もあがり、臨床応用までもう一步となった。「どこで身を削って成果をみせなければならぬ時期がある」。一つ一つ積み上げてきた経験が武岡にこう言わせる。

丹念に調べると、人工赤血球の膜となる脂質の純度が低いことに原因があった。そこでクリンルームでの生成を始め、生産委託できる協力企業が見つかった。ここに、学生たちには、好奇心を満たしていた研究の虫は、人工赤血球を実用化する夢をかなえるために、毎日何か新しい発見がないかと実験室に通う。

（松田省吾）



（たけおか・しんじ）一九六三年生まれ、東京都出身。九一年早稲田大学理工学
研究科修了、同学部助手。九三年専任講師、
九六年より現職。九八―九九年、ベンシルペ
ニア大学の客員研究員兼務。

(松田省吾)