

図 16.4.8 組替アルブミン変異体 - プロトヘム (口絵 52 参照)

プロトヘムアルブミンのサブドメイン IB に包接のようにヘム面直下の軸配位を Ile-142 を His に変換し、軸配位 Tyr-161 を疎水性の Leu に変換すると、Hb のヘムポケットと類似の分子空間構成、酸素との結合を可能にする。プロトヘムを用い、水中、室温下で酸素錯体を確認した初めての例 (2005 年)。

に成功し、プロトヘムがサブドメイン IB 内に Tyr-161 との軸配位結合およびプロピオン酸側鎖と 3 つの塩基性アミノ酸残基 (R114、H146、K190) 間との静電的相互作用により固定が明らかにされ (図 16.4.8)<sup>21)</sup>、アルブミンのプロトヘム結合サイトは疎水性アミノ酸残基から構成されているので、ヘム鉄の配位圏内に近位塩基 (His) を導入すれば、Hb のヘムポケットと同様なナノ分子空間が構築できるとの着想から、ヘム鉄に最も近い距離にあるアミノ酸残基イソロイシン 142 (H142) を選定し、遺伝子組替法によりこれらをヒスチジン (His) へ変換、さらに軸配位のチロシン 161 (Y161) をロイシン (L) に変換、得られた rHSA (mutant) にプロトヘムを包接、アルブミン-プロトヘムを得る。アルゴン雰囲気下で中心鉄 (III) を還元すると、Hb のデオキシ体によく似た可視吸収スペクトルが得られた<sup>22)</sup>。これはイミダゾールが 1 つ結合した Fe (II) 5 配位高スピン錯体の形成を示しており、H142 が中心鉄に軸配位が解明され、これに酸素通気により速やかに酸素錯体型へと移行する。また一酸化炭素に接触させると、安定なカルボニル錯体を得られ、そのスペクトルパターンも carbonyl Hb と類似を確認した。これは天然のプロトヘム利用で、水中、室温で安定な酸素錯体が形成の初めての例である。

#### 4.4 おわりに

本稿で紹介した人工赤血球の開発とは別に、最近の試みとして、血液幹細胞に各種サイトカインを作用させ、赤血球のみを選択的に増殖させる新技術も明らかにされ期待されてはいる。投与量確保に至っていないのが実情で、ただし人工赤血球は、赤血球の体内寿命 (120 日) に比較してきわめて短い (3 日程度) ため短時間の使用に限られるが、血液型や感染源がなく、長

期間保存できる点は赤血球の性能を凌いでいる。輸血代替としての利用はもちろん、移植臓器灌流液、組織再生時の細胞呼吸への酸素供給、さらに赤血球よりも小粒径である利点を生かした新しい適応 (虚血性領域の酸素化、抗腫瘍効果増強など) も提案され、近未来の医療に著しい変革をもたらすものとの予告とみる事が可能であろう。

【謝辞】本研究は厚生労働科学研究 (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) として推進された。早稲田大学および慶應義塾大学の大勢の研究者の御尽力に対し、ここに記して謝意を表する。

#### 文献

- 1) Kobayashi K, et al: Artificial Oxygen Carrier, Its Front Line. Springer-Verlag, Tokyo, 2005
- 2) Tsuchida E: Artificial Red Cells. Wiley, Chichester, 1998
- 3) Djordjevic L, et al: Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. FASEB Proc 36: 567, 1977
- 4) Sakai H, et al: Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. Protein Expr Purif 4: 563-569, 1993
- 5) Sou K, et al: Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles. Bioconjugate Chem 11: 372-379, 2000
- 6) Sakai H, et al: Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. Bioconjugate Chem 11: 425-432, 2000
- 7) Sakai H, et al: Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. Crit Care Med 32: 539-545, 2004
- 8) Sakai H, et al: Acute 40 % exchange transfusion with Hb-vesicles (HbV) suspended in recombinant HSA solution: Degradation of HbV and erythropoiesis in rat spleen observed for 2 Weeks. Transfusion (in press)
- 9) Sou K, et al: Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. J Pharmacol Exp Ther 312: 702-709, 2005
- 10) Sakai H, et al: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. Am J Pathol 159: 1079-1088, 2001
- 11) Sakai H, et al: 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: 874-884, 2004
- 12) Sakai H, et al: Oxygen Releasing of Hb-vesicles with different P<sub>50s</sub> from Occluded Arteriole in Hamster Skinfold Window Model. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288: H2897-H2903, 2005

- 13) Contaldo C, et al: New generation of hemoglobin-based oxygen carriers evaluated for oxygenation of critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med* **33**: 806-812, 2005
- 14) Tsuchida E, et al: Human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) derivative as a totally synthetic O<sub>2</sub>-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* **10**: 797-802, 1999
- 15) Komatsu T, et al: Effect of heme structure on O<sub>2</sub>-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: Intramolecular histidine coordination provides a stable O<sub>2</sub>-adduct complex. *Bioconjugate Chem* **13**: 397-402, 2002
- 16) Curry S, et al: Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding site. *Nat Struct Biol* **5**: 827-835, 1998
- 17) Tsuchida E, et al: Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res* **64A**: 257-261, 2003
- 18) Kobayashi K, et al: Oxygenation of hypoxia region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res* **64A**: 48-51, 2003
- 19) Komatsu T, et al: Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein "albumin-heme" into an acute anemia rat model after seventy-percent hemodilution. *J Biomed Mater Res* **71A**: 644-651, 2004
- 20) Komatsu T, et al: Physicochemical characterization of cross-linked human serum albumin dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier. *Biochim Biophys Acta* **1675**: 21-31, 2004
- 21) Zunszain P, et al: Crystal structural analysis of human serum albumin complexes with hemin and fatty acid. *BMC Struct Biol* **3**: 6, 2003
- 22) Komatsu T, et al: Dioxygenation of human serum albumin having a prosthetic heme group in a tailor-made heme pocket. *J Am Chem Soc* **126**: 14304-14305, 2004

(土田英俊、酒井宏水、小松晃之、小林紘一)

先端医療シリーズ 37

## 人工臓器・再生医療の最先端

---

発行 2005年11月28日 初版第1刷 ©  
編集主幹 許 俊鋭・斎藤 明・赤池敏宏  
編集委員 西田 博・澤 芳樹・浅原孝之・清水達也  
発行者 代表取締役 寺田弘司  
株式会社寺田国際事務所／先端医療技術研究所  
〒171-0031 東京都豊島区目白 2-16-19  
池袋若林ビル 11F  
電話 03-5957-1180 FAX 03-5957-1182  
E-mail:kterada@t3.rim.or.jp  
<http://www.t3.rim.or.jp/~kterada/>  
印刷 株式会社ブレインズ・ネットワーク

---

(無断複写・転写を禁ず)

ISBN4-925089-45-5 C3047

定価 9,800 円(税込)

Printed in Japan

## 第5章 人工赤血球

酒井宏水\*<sup>1</sup>, 宗 慶太郎\*<sup>2</sup>, 武岡真司\*<sup>3</sup>, 小林紘一\*<sup>4</sup>, 土田英俊\*<sup>5</sup>

### 1 輸血代替の必要性

我が国の献血輸血システムは、世界的に見ても最高水準にあるといえる。安全な輸血用血液が医療機関に常備され、国民の健康福祉に大きく貢献していることは言うまでもない。肝炎やエイズなど輸血に伴う感染も大きな社会問題となったが、献血血液の厳重な検査と管理が強調され、常に被害を最小限に留めるために尽力している。特に核酸増幅法（NAT 検査）の採用の効果は多大である。しかし、検査項目から外れる病原体の存在、狂牛病や西ナイル熱、それに未知の感染源の存在の脅威に常に曝され、献血者の問診の徹底や献血の規制などゼロリスクを目指した新たな試みもなされている。その他の課題として、赤血球の保存期限は採血後わずか3週間、それに過誤を含め血液型不適合の医療事故もある。輸血回避のため、術中輸血開始目安の Hb 濃度 10g/dl の低減、低温無輸血手術、自己血輸血の推奨と血液希釈、赤血球造血因子（EPO）投与による術前貯血も普及してきてはいるが、症例によっては適用できない。他方、献血1回当りの採血量は400 ml になったが、人口の高齢化に伴い健康献血者の総数は低下しつづけている。我が国のように地震などの自然災害が危惧される場合、緊急需要に対応した大量供給ができることは重要な国家的施策でもあり、感染の可能性を危惧することなく、血液型に関係なく、要請に即応していつでもどこでも必要量を直ちに供与できる、赤血球の機能を代替する酸素輸液の出現が強く期待されているところである。

---

\* 1 Hiromi Sakai 早稲田大学 理工学総合研究センター 助教授

\* 2 Keitaro Sou 早稲田大学 理工学総合研究センター 講師

\* 3 Shinji Takeoka 早稲田大学 理工学術院 教授

\* 4 Koichi Kobayashi 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授

\* 5 Eishun Tsuchida 早稲田大学 理工学総合研究センター 名誉教授；顧問研究員

## 2 赤血球構造（膜）の重要性

赤血球は直径約  $8\mu\text{m}$  の中窪み円盤状粒子であり、酸素を結合できる蛋白質ヘモグロビン (Hb, 分子量 64,500) の高濃度溶液 (約 35%) を赤血球膜に内包した構造を持つ。人工赤血球の歴史を紐解くと、最初は Hb が酸素結合部位であるのなら、血液型抗原が存在する赤血球膜を除去し Hb を精製単離して用いればよいのでは、という安易な発想から研究開発が始まったことが解る<sup>1)</sup>。特に、戦後に精製ヒト Hb の投与試験が盛んに実施されたが、血圧亢進、腎毒性、出血、それに極めて短い滞留時間が問題となり当然成功しなかった。1990 年代から欧米で Hb 分子を加工した Hb 修飾体 (分子内架橋型、重合型、高分子結合型) などを対象にした臨床試験が推進されたが、全般としては投与の修飾 Hb が血管内皮細胞由来の弛緩因子 NO を吸着するために生起する血管収縮 (血圧亢進)<sup>2)</sup>、Hb との直接接触による血管内皮の障害<sup>3)</sup>、また、代謝異常や軽度の神経性副作用の指摘もあり、いずれもが全て赤血球とかけ離れた構造が原因となることが明らかにされた。

Hb 溶液が赤血球膜で覆われている理由は、①35%濃厚 Hb 溶液の高い粘度と膠質浸透圧の抑制、②本来毒性のある Hb 逸脱の抑制、③Hb 機能維持のための各種リン酸などエネルギー分子、解糖-ならびに還元-酵素系の保持の役割もある。また、④血液 (血球分散系) は非 Newton 流体で、体内循環とくに末梢血管内における特色ある流動形式と生理作用 (ホメオスターシス) が特性である。これら赤血球本来の構造と機能の関係が初めからわかっていたら、小胞体 (細胞型) 構造なら無害で投与妥当との結論が容易に想像できたはずである。

1950~1960 年代に Chang や豊田らはすでに、高分子薄膜でできた球の中に Hb を内包する方式を検討していた<sup>4,5)</sup>。使用された高分子材質はナイロン、コロジオン、ゼラチン、アラビアゴム、シリコンなどであった。また、エマルション粒子の中にヘモグロビンを封入し、カプセル化する方法も検討された。しかし、いずれも粒径制御や分散性に問題があり、具体的な成果を得ていない。1960 年代後半に両親媒性分子であるリン脂質が水中で二分子膜を形成しこれが小胞構造 (liposome) に成ることが Bangham によって報告され<sup>6)</sup>、1970 年代初めに Djordjevic (Univ. Illinois, Rush Presbyterian Med. Center) らは、リン脂質小胞体に Hb を内包した "Synthetic Erythrocyte" の研究を開始した<sup>7)</sup>。しかし、粒径制御など調製の困難さ、血漿蛋白質との相互作用に起因する凝集阻止に十分な手段を得なかったため具体化しなかった。

## 3 ヘモグロビン小胞体の構成

リン脂質二分子膜で高濃度 Hb 溶液を被覆する技術と、特に毛細血管を容易に通過できる粒径

## 第5章 人工赤血球

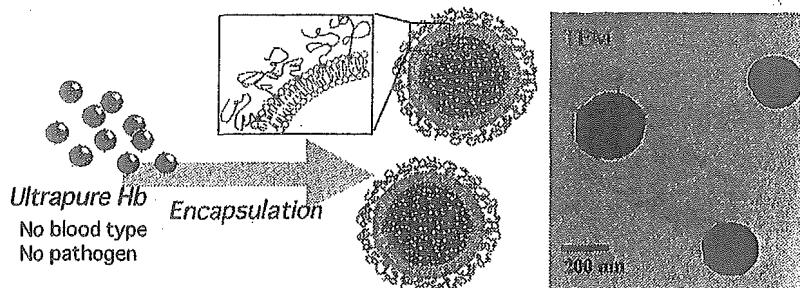


図1 ヘモグロビン小胞体

期限切れ赤血球より精製単離した高純度 Hb をリン脂質二分子膜で被覆する。さらに粒子表面には PEG 鎖で修飾する。右側の透過型電子顕微鏡写真から、制御された粒子径 (250 nm) と、内水相に Hb が濃度高く内包されている様子がわかる<sup>11)</sup>。

の制御、また血中分散安定度向上は、高分子と分子集合の科学に立脚した工夫 (1990 年代) を組込んでようやく完成できた<sup>1)</sup> (図 1)。高純度 (99.9% 以上) 高濃度の精製 Hb 溶液, extrusion 法の採用により, Hb 溶液 (濃度 35% 以上) を包んだ小胞体として得られ<sup>8~12)</sup>, Synthetic erythrocyte の問題点を解決した。検査済み献血由来の期限切れ赤血球から精製した濃縮 Hb 利用で感染源はない建前であるが, 精製に際して Hb に一酸化炭素 (CO) を結合させ安定化を計り, 60℃の加熱処理 (pasteurization) とウイルス除去膜処理 (ultrafiltration) の組合せで安全性を確保する<sup>13~15)</sup>。最終段階で光照射励起により酸素を結合した HbO<sub>2</sub> に変換。アロステリック因子を添加して酸素親和度の制御 ( $P_{50} = 27 \sim 32$  Torr) が<sup>6)</sup>できる<sup>16)</sup>。ポリエチレングリコール (PEG) 結合脂質を粒子表面に配置して小胞体粒子間の凝集抑制と分散安定度向上の効果を観測<sup>17)</sup>, この表面修飾過程を動力学的に明らかにし, 溶液のまま室温にて 2 年以上保存できる系が構築できた<sup>18)</sup>。開発当初, リン脂質小胞体は極めて不安定な構造であるというのが一般常識であり, リン脂質分子内の脂肪酸に重合性基 (ジエン基など) を導入することが検討され<sup>19)</sup>,  $\gamma$  線照射重合により極めて安定な小胞体構造を得ることに成功したものの<sup>20)</sup>, 細網内皮系における代謝分解に問題があった<sup>21)</sup>。しかしその後, 通常の飽和型脂質 (ジパルミトイルホスファチジルコリン) でも所定の比率でコレステロールや負電荷脂質と混合し, さらに小胞体粒子表面を PEG で修飾すれば, 支障のない分散安定度と保存安定度および血液適合性が得られることが明らかとなったのである。

人工赤血球は当然医薬品であるので GMP (Good Manufacturing Practice) 基準の無菌的製造が前提となるが, 製造工程および製品の無菌性を保証するためいわゆるエンドトキシン (グラム陰性菌体の細胞外膜成分であるリポポリサッカライド: LPS) が基準以下であることを実証することが極めて重要となる。LPS は約 8 本のアルキル鎖が高分子糖鎖に結合した両親媒性分子で

## 医療用マテリアルと機能膜

あるため、リン脂質小胞体の二分子膜に容易に挿入され、常法 (Limulus Amebocyte Lysate Test) による定量測定を阻害することが問題とされていた。しかし、これを克服することに成功し<sup>22)</sup>、製造工程の無菌性をモニタリングし、常に 0.2EU/mL 以下であることを保証している。

これら新しい観点からのプロセスエンジニアリングによる製造工程の効率化を課題として研究を重ね、パイロットプラントの基本設計を完了している。

### 4 ヘモグロビン小胞体による酸素輸送効果

医療現場とくに救急医療や外科的手術において、血液型不一致や感染の心配をせずに、いつでも要求に応じて投与できる、輸血代替としての酸素輸液が求められている。この場合、酸素輸液の必須条件は、投与後の全身管理の主な項目：循環動態やガス交換、それに末梢組織の酸素化が輸血をした場合と同等に正常値に保たれることである。

#### 4.1 血液希釈

Hb 小胞体の動物投与試験 (ラット) では、交換輸血法で循環血液量の実に 90% 超過の交換でも血圧が維持され、また血液ガス組成も腎皮質の酸素分圧も正常値を推移することが確認された<sup>23~26)</sup>。また、臨床現場で想定される最大の交換率 40% の交換輸血においても全例が生存し、ヘマトクリット (赤血球体積分率) が 1 週間で完全に回復する<sup>27)</sup>。したがって、術前血液希釈、術中出血分の補給、さらに人工心肺 (ECMO) 体外循環回路の補充液としての利用が期待できる<sup>28)</sup>。特に小児患者の体外循環では、無輸血充填とした場合 (血漿増量剤の充填)、術中の短時間の Hb 濃度の低下が脳に障害を与え、術後の知能発達に影響をおよぼすとされており、Hb 小胞体を充填液として用いることの利点が期待されている。

Hb 小胞体生理塩溶液の膠質浸透圧はゼロなので、血液交換率が高い場合には循環血液量を正常に維持するために当然、血漿増量剤の添加が必要となる。例えば、5% アルブミン (生理条件) に分散させた場合の膠質浸透圧は 20 Torr (血液は 20~25 Torr)<sup>29)</sup>、粘度と浸透圧はほぼ血液と同等になり、循環動態の恒常性に寄与する。Hb 小胞体の粒径は赤血球の約 1/30 と小さく、血漿中に均一に分散する。赤血球と混合して微小血管モデル (内径 28  $\mu\text{m}$ ) を流動させたときの顕微鏡観察の結果、赤血球のような大粒子は管の中央部を流れるが、Hb 小胞体は結果として管壁の近くに偏る傾向 (Near-Wall Excess) が認められた<sup>30)</sup> (図 2)。無麻酔下ハムスターの 80% 交換輸血における皮下微小循環動態の検討から、微小血管内を流動する PEG 修飾 Hb 小胞体に凝集は認められず、血漿相に均一分散しているが<sup>31, 32)</sup>、表面未修飾の Hb 小胞体では細静脈や毛細管内など、流速が比較的遅い部位で凝集体が観測されている (図 3)。血流速度、有効毛細管

## 第5章 人工赤血球

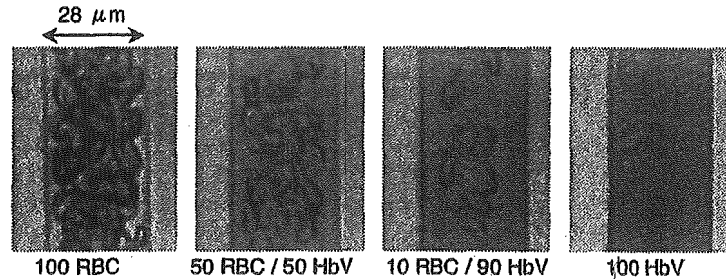


図2 微小モデル血管（内径28 $\mu$ m）を流動するHb小胞体と赤血球の混合液

赤血球のみの場合、管壁近傍に透明な血漿層が存在する。Hb小胞体の分量を多くすると、次第に血漿層が濁ってくる。この倍率ではHb小胞体の粒子は確認できないが、濁度変化からHb小胞体が血漿中に均一に分散している状態がわかる<sup>30)</sup>。

密度、組織酸素分圧ともに表面修飾系が未修飾系に比べて極めて高い数値として推移することからも、表面PEG修飾が不可欠であることが明示された。

### 4.2 出血ショック蘇生液

さらに、出血ショック時の蘇生液としても検討され<sup>33-35)</sup>、赤血球と同等の酸素運搬機能が実証された。例えば、Sevoflurane麻酔下、ラットの循環血液量の50%を脱血して15分後にHb小胞体をリコンビナントアルブミンに分散させて投与し6時間観察した。リコンビナントアルブミン単独の投与では8匹中2匹が死亡したのに対し、Hb小胞体投与群では循環動態も血液ガス組成も脱血液の投与と同等に推移し全例生存した（図4）。これらの結果は、室温で備蓄可能なHb小胞体を、緊急時に投与して出血ショックの患者を蘇生させることができる可能性を意味している。

### 4.3 低酸素領域への酸素輸送

ヒト赤血球の酸素親和度（ $P_{50}$ ：酸素が50%結合飽和するときの酸素分圧）は、37℃で約28 Torrである。全身の酸素消費量は、動脈血酸素分圧（110 Torr）と静脈血酸素分圧（40 Torr）の間の酸素飽和度較差（A-V較差、ヒト赤血球の場合は25%程度）とHb濃度、それに心拍出量の積として算出される。赤血球から精製単離したHbの $P_{50}$ は8 Torr程度と低く、静脈血酸素分圧（40 Torr）では到底酸素を放出しないので、Hbを利用する人工酸素運搬体の $P_{50}$ も、赤血球と同等あるいはそれ以上に調節すべきと極めて明快に考えられてきた。

正常の組織であればこの理論が成り立つであろう。しかし、血管性障害により十分な血流が行



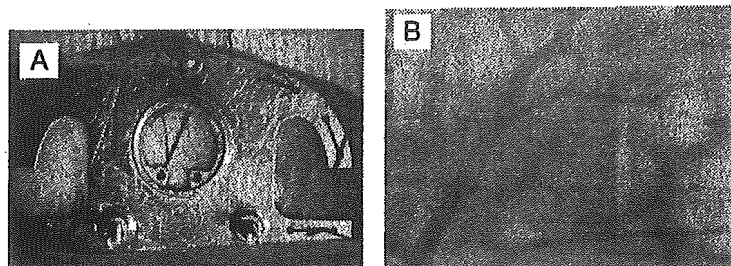


図3 ハムスター皮下微小循環観察モデルと、Hb 小胞体投与後の微小循環動態  
(A) 体重約 60g のハムスター背部皮膚に硝子製の窓枠を装填することにより、顕微鏡下、細動静脈、毛細血管内の赤血球の流動状態や血管径、組織酸素分圧の観察が可能と成る。  
(B) この動物実験モデルを用い、覚醒下 PEG 鎖で修飾した Hb 小胞体で循環血液量の 80% を交換すると、Hb 小胞体が血漿中に均一分散しているので、毛細管の形状が見える。PEG で修飾しないと、凝集体が多数観測された<sup>31)</sup>。

き届かない組織（虚血性領域）の場合、血流速度も組織酸素分圧も極度に低下しているので、動脈血はこの領域に到達する前にすでに酸素をほとんど放出してしまう。したがって、酸素親和度を赤血球よりも大きく（ $P_{50}$  値を小さく）すれば、虚血性領域に到達してから酸素を放出できると考えた<sup>36, 37)</sup>。このとき、赤血球よりも小粒径の人工赤血球（250 nm 径）は、血漿中に均一分散しているので、赤血球が行き届かない狭窄部を經由して到達できる。このような仮説の下、これまでにハムスター有茎皮弁虚血モデルにおいて、高酸素親和度 Hb 小胞体（ $P_{50}=15$  Torr）で血液希釈することにより虚血領域の酸素分圧が有意に上昇できることを明らかにした<sup>38, 39)</sup>。したがって、輸血代替としての利用以外の酸素治療剤として、例えば脳や心筋など虚血領域の酸素化、腫瘍組織の酸素化など、低酸素領域へ選択的な酸素ターゲティングとしての利用が期待できる。Hb 小胞体の酸素親和度はアロステリック因子により自在に調節できるので<sup>16)</sup>、各々の症例に相応しい  $P_{50}$  を有するテイラーメイド人工赤血球が可能になる。

## 5 ヘモグロビン小胞体の安全度

### 5.1 血液適合性

臨床試験開始前にヒトを対象としてできる試験は唯一、採血液との相互作用の検討である。Hb 小胞体の粒子表面は PEG 修飾してあるので、血漿蛋白質との相互作用が低減され、凝集は生起せず、血液と同等の溶液粘度を示す。血小板の活性化の有無を、RANTES とセロトニンの放出量、PAC-1 の発現量の変動から検討し、活性化しないことを確認した<sup>40)</sup>。カリクレイン-ニキシン系の活性化も、粒子表面の陰性荷電への接触が引金となるが、負電荷脂質成分をホスファチ

## 第5章 人工赤血球

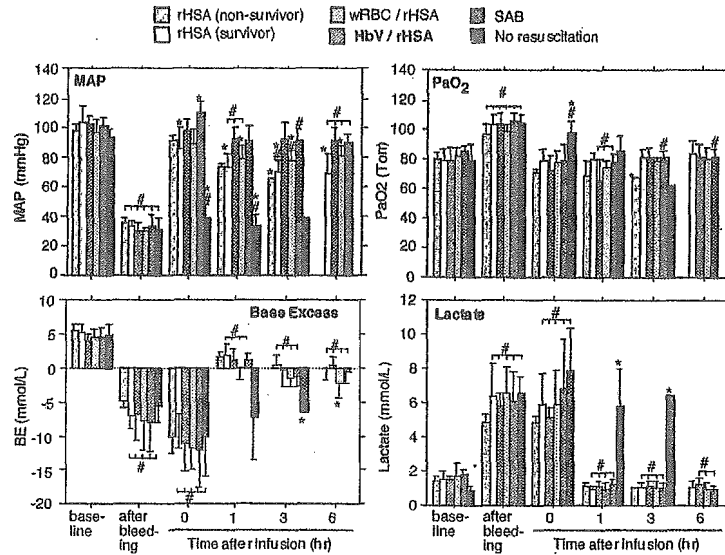


図4 Hb小胞体による出血ショック蘇生試験

Sevoflurane 吸入麻酔下，ラット循環血液量の50%を脱血し15分経過後，Hb小胞体をリコンビナントアルブミン (rHSA) に分散させた HbV/rHSA, rHSA 単独，脱血液 (SAB)，または洗浄赤血球を rHSA に分散させた溶液 (wRBC/rHSA) を投与した。ショック状態では血圧の低下，代償機能により過呼吸となり，動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>) の上昇，pH と塩基余剰 (Base Excess) の低下がみられる。HbV/rHSA 投与後では血圧，血液ガス組成ともに脱血液 (SAB) の投与と同等である。総てのパラメータで rHSA 単独投与群と比較して有意に優れている。蘇生液を投与しないと全例が3時間以内に死亡する。rHSA 群は8匹中2匹が死亡したが，HbV/rHSA 群は全例が生じた。<sup>#</sup>p<0.05 vs. baseline, <sup>\*</sup>p<0.05 vs. HbV/rHSA

ジルグリセロールからカルボン酸型の合成脂質に換えることにより，この活性化を回避することに成功。また，多核球の走化能への影響もないことを確認している<sup>41)</sup>。

### 5.2 循環動態の恒常性

修飾 Hb 投与に際し血圧の異常亢進や，血管床への血小板沈着などの副作用が認められているが，これは NO との高い親和度に起因すると考えている<sup>1)</sup>。ハムスター皮下微小循環系の抵抗血管径と血圧の変動を追跡した実験では，修飾 Hb (特に分子内架橋 Hb, 粒径 7 nm) で最も抵抗血管径が収縮し，同時に顕著な血圧亢進を示した。血管収縮は末梢循環を阻害し，組織へ十分量の酸素が供給されなくなる。粒子径が大きくなるにつれこれらの変動の程度は弱くなり，直径 250 nm の Hb 小胞体では，血管収縮も血圧亢進も起こらないことが確認されている<sup>42)</sup>。Hb 小胞体の NO の結合速度定数をストップドフロー法で測定したところ  $4.8 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と判明し，こ

## 医療用マテリアルと機能膜

これは分子状 Hb 溶液の結合速度定数 ( $3.0 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) よりも一桁遅いので、小胞体に濃度高く内包することで NO の結合はある程度抑制されている<sup>43)</sup>。しかし赤血球の NO 結合速度 ( $5.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) に比較すると二桁もまだ速いことになり、NO 結合速度の違いだけでは説明できない。現在のところ、分子状の修飾 Hb は、血管内皮細胞層を透過して血管内平滑筋近傍に到達し、内皮細胞が産生する NO を捕捉し血管弛緩機能を低下させるが、粒径 250 nm の Hb 小胞体では赤血球と同様に平滑筋までは到達できず、血管内腔に留まるため、血管収縮も血圧亢進も起こらないと考えている (図 5)。

肝臓中では肝実質細胞にある hemoxygenase がヘムを分解する。実はこの際に産生する一酸化炭素 (CO) が、血管弛緩因子として血管内壁の Ito 細胞に作用することが初めて明確に示された。摘出肝灌流中の微小循環動態の検討では、類洞血管の孔 (穿孔篩: fenestration, 孔径約 100 nm) よりも小さい修飾 Hb (7 nm) は、これを容易に通過して Disse 腔に侵入し、肝実質細胞で代謝され、bilirubin 排泄の亢進と同時に CO を放出するが、CO 親和性の高い血中 Hb に捕捉され、結果として 20% の血管抵抗増大と同時に、類洞の不連続的狭窄と流動停止領域の存在を確認している (図 6)。他方、Hb 小胞体では粒径が 250 nm と大きいため、類洞血管の孔を透過できず肝実質細胞に到達しないので、この現象は生起しない。この間灌流圧は一定値に保たれている<sup>44, 45)</sup>。この結果は、臓器移植の際に Hb 小胞体を灌流液として安全に使用できることも意味しており、摘出してから移植までの所要時間を延長できるので、移植臓器をこれまでよりも遠隔地に運搬することが可能になると考えられる。

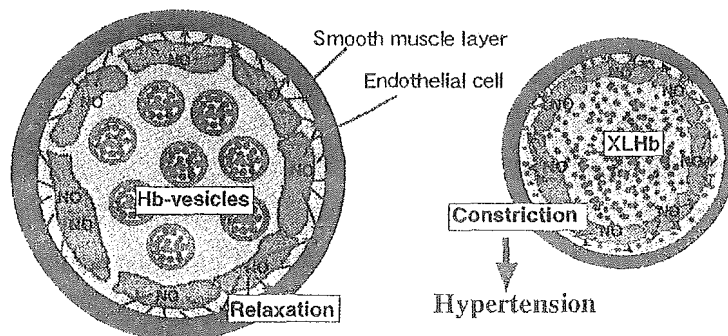


図 5 修飾ヘモグロビン投与による血管収縮の機序

血管内皮層を透過した粒径の小さい Hb は内皮細胞由来弛緩因子 (NO) が平滑筋に到達する前に捕捉しやすく、これが血管収縮につながるものと考えられる。他方、Hb 小胞体では血管内に留まるため、NO 捕捉反応は抑制され、血管収縮は起こらない<sup>42)</sup>。

## 第5章 人工赤血球

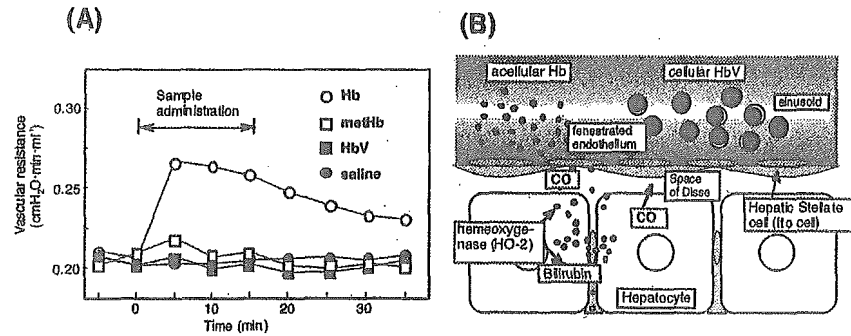


図6 肝の微小循環動態とHb代謝

(A)精製Hb溶液で摘出肝を灌流すると灌流圧が上昇するが、Hb小胞体とmetHbの場合は灌流圧は上昇しない。このことは(B)のように説明できる。Hb分子は類洞血管の孔(fenestration)を通してDisse腔に容易に拡散し、hemeは肝実質細胞のhemeoxygenase-2により代謝され、ビリルビンとCOを排泄する。本来COは類洞血管を覆うIto細胞に血管弛緩因子として作用するが、Disse腔でHbに捕捉され弛緩作用低下のため、灌流圧増大につながると理解される。他方、Hb小胞体は篩孔より大きいので通過せず、代謝に入らずまたCOを結合しないため肝臓の微小循環はほとんど低下しない。またmetHbはDisse腔に拡散するがCOを結合しないため変化なし<sup>44)</sup>。

### 5.3 代謝過程

酸素輸液の投与は必然的に血液の大半を置換するくらいの大量投与が前提となるので、成分の体内動態と代謝過程を詳細に検討する必要がある。これまでの検討の結果、投与されたHb小胞体は最終的に、貪食細胞が多く存在する脾、肝、骨髄など、いわゆる細網内皮系(RES)に移行することが同位元素(<sup>99m</sup>Tc)修飾したHb小胞体の体内動態の観測から解明され<sup>46)</sup>、RES機能への影響とHb小胞体の構成成分の代謝確認も実施された。これらの詳細検討は、貪食細胞に捕捉されたHb小胞体が7日以内に分解消失し<sup>47)</sup>(図7)、また脾臓重量も一過性増大を示すが7日後には正常値に戻り、血液生化学検査でも異常値は認められていないので<sup>48, 49)</sup>、老化赤血球の代謝経路と同様と考えている。また、40%の血液を急速交換した後の生存試験(ラット)では、約1週間後には赤血球量は正常値にまで回復していることから<sup>27)</sup>、Hb小胞体の成分が造血に有効利用されていることも考えられ、現在詳細を検討している。

### 5.4 反復投与試験

新薬の非臨床試験において安全度確認のための項目の一つに、GMP基準で製造された試料について齧歯類およびその他の動物を対象とした反復投与試験がある。予備的にラットに対してHb小胞体の反復投与試験(投与量10ml/kg/日を14日間投与)を実施し、循環血液量の実に2.5倍もの分散液を投与したが、体重は増加し続け、血液生化学的、組織病理学的検討でも顕著な副

医療用マテリアルと機能膜

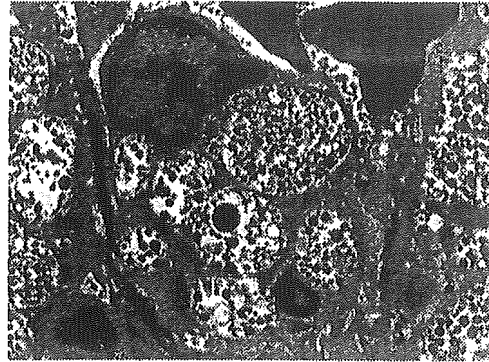


図7 ヘモグロビン小胞体の代謝過程

Hb 小胞体投与 1 日後のラット脾臓 macrophage の透過型電子顕微鏡写真。食胞 (phagosome) 中に Hb 小胞体の粒子が多数認められる。7 日後には消失。蓄積は全く認めない<sup>47)</sup>。

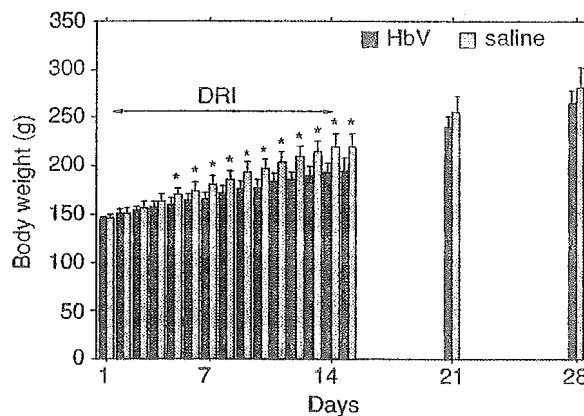


図8 ヘモグロビン小胞体の反復投与試験

ラットに Hb 小胞体を 14 日間連続投与 (DRI, 10 ml/kg/day × 14 days) 後, 2 週間全例生存した。体重は略々直線的に増加し続けた。ラットの循環血液量は 56 mL/kg なので, 総投与量 (140 mL/kg) はその 2.5 倍に匹敵する。5 日以降, 生理食塩水投与群と比較して有意差が認められるが (\*印), 21, 28 日では有意差はない。15 日目の剖検では肝脾重量と血中脂質濃度の一過性増大が認められたが, 血中ビリルビンや鉄の放出もなく, 細網内皮系のヘム代謝も許容範囲内であることが明らかとなった<sup>50)</sup>。

作用がなく, Hb 小胞体の成分が速やかに代謝される過程が結果として得られ, 安全度が極めて高い製剤であることが証明されている<sup>50)</sup> (図 8)。

## 第5章 人工赤血球

### 6 おわりに

酸素輸液の研究は、この30年間に具体的対象物についての物性と動的機能の相関が解明できるようになってきている。修飾Hbを用いる酸素輸液の研究は臨床試験の最終段階にきてはいるが、各種副作用が問題提起となっている。結局は赤血球と同様な被覆膜を持つ構造(Hb小胞体)が理想であるとの結論に至ろうとしている。また、今回は割愛させていただいたが、別途の展開としてヘム-リン脂質誘導体を利用した、小胞体構造の自己集合体、さらにそのアルブミン担持体(アルブミン-ヘム)についても同様の成功を確かめており、酸素運搬機能が実証されている<sup>51)</sup>。人工赤血球は赤血球と比べて体内寿命が短いので短期間の利用(3日程度)に限られるが、血液型や感染源がなく、長期間保存できる点は赤血球の性能をしのいでいると言える。健常動物(ラット)の場合には投与のみで存命し得ること、また早い時間にショック状態から回復が可能であるなど、輸血代替としての利用はもちろん、さらに赤血球よりも小粒径である利点を生かした新しい適応(梗塞部位の酸素化、抗腫瘍効果増強など)も提案されており、医療に著しい変革をもたらすことが期待されている。

### 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金により推進された。ここに記して謝意を表します。

### 文 献

- 1) E. Tsuchida (ed.), *Blood substitutes, present and future perspective*, Elsevier, Amsterdam (1998)
- 2) E. P. Sloan *et al.*, *JAMA*, **282**, 1857 (1999)
- 3) K. Burhop *et al.*, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **32**, 353 (2004)
- 4) T. M. S. Chang, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **10**, 5 (1984)
- 5) 豊田忠之, *科学*, **35**, No. 1, 7 (1965)
- 6) A. D. Bangham *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **8**, 660 (1964)
- 7) L. Djordjevich *et al.*, *FASEB Proc.*, **36**, 567 (1977)
- 8) S. Takeoka *et al.*, *Artif. Organs Today*, **3**, 129 (1993)
- 9) H. Sakai *et al.*, *Protein Expression Purif.*, **4**, 563 (1993)
- 10) S. Takeoka *et al.*, *Langmuir*, **12**, 1755 (1996)
- 11) H. Sakai *et al.*, *Biotechnol. Progress*, **12**, 119 (1996)

医療用マテリアルと機能膜

- 12) K. Sou *et al.*, *Biotechnol Progress*, **19**, 1547 (2003)
- 13) Y. Naito *et al.*, *J. Artif. Organs*, **5**, 141 (2002)
- 14) I. Fukutomi *et al.*, *J. Artif. Organs*, **5**, 102 (2002)
- 15) H. Sakai *et al.*, *J. Biochem.*, **131**, 611 (2002)
- 16) L. Wang *et al.*, *Polymer Adv. Technol.*, **4**, 8 (1993)
- 17) K. Sou *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 372 (2000)
- 18) H. Sakai *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 425 (2000)
- 19) E. Tsuchida *et al.*, *Macromolecules*, **25**, 207 (1992)
- 20) T. Satoh *et al.*, *ASAIO J.*, **38**, 580 (1992)
- 21) K. Akama *et al.*, *Polymer Adv. Technol.*, **11**, 280 (2000)
- 22) H. Sakai *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **93**, 310 (2004)
- 23) Y. Izumi *et al.*, *Crit. Care Med.*, **24**, 1869 (1996)
- 24) H. Sakai *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 23 (1997)
- 25) K. Kobayashi *et al.*, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.*, **25**, 357 (1997)
- 26) Y. Izumi *et al.*, *ASAIO J.*, **43**, 289 (1997)
- 27) 酒井宏水ほか, *人工血液*, **12**, 44 (2004)
- 28) 山崎真敬ほか, *人工臓器*, **33**, S206 (2004)
- 29) H. Sakai *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 56 (2000)
- 30) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H2543 (2003)
- 31) H. Sakai *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 66 (1998)
- 32) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **276**, H553 (1999)
- 33) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H1191 (2002)
- 34) A. Yoshizu *et al.*, *ASAIO J.*, **50**, 458 (2004)
- 35) H. Sakai *et al.*, *Crit. Care Med.*, **32**, 539 (2004)
- 36) P. Cabrales *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288**, H1885 (2005)
- 37) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288** (2005), 印刷中
- 38) D. Erni *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1702 (2003)
- 39) C. Contaldo *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H1140 (2003)
- 40) S. Wakamoto *et al.*, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.*, **29**, 191 (2001)
- 41) T. Ito *et al.*, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.*, **29**, 427 (2001)
- 42) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H908 (2000)
- 43) H. Sakai *et al.*, *Polymer Adv. Technol.*, **7**, 639 (1996)
- 44) N. Goda *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **101**, 604 (1998)
- 45) T. Kyokane *et al.*, *Gastroenterology*, **120**, 1227 (2001)
- 46) K. Sou *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 702 (2005)
- 47) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **159**, 1079 (2001)
- 48) H. Sakai *et al.*, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 222 (2003)
- 49) H. Sakai *et al.*, *Biomaterials*, **25**, 4317 (2004)
- 50) H. Sakai *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 874 (2004)
- 51) Y. Huang *et al.*, *ASAIO J.*, **50**, 525 (2004)

## 医療用マテリアルと機能膜

---

2005年5月31日 第1刷発行

---

監修 樋口亜紺 (T0445)  
発行者 島 健太郎  
発行所 株式会社シーエムシー出版  
東京都千代田区内神田1-13-1 豊島屋ビル  
電話 03(3293)2061  
大阪市中央区釣鐘町1-1-1 大宗ビル  
電話 06(4794)8234  
<http://www.cmcbooks.co.jp/>

---

[印刷 倉敷印刷株式会社]

© A. Higuchi, 2005

落丁・乱丁本はお取替えいたします。

本書の内容の一部あるいは全部を無断で複写(コピー)することは、法律で認められた場合を除き、著者および出版社の権利の侵害となりますので、その場合には予め小社宛許諾を求めて下さい。

**ISBN4-88231-503-3 C3043 ¥65000E**



# Hemoglobin Vesicles as a Molecular Assembly: Characteristics of Preparation Process and Performances as Artificial Oxygen Carriers

Hiromi Sakai, Keitaro Sou, Shinji Takeoka,  
Koichi Kobayashi\* and Eishun Tsuchida

Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda  
University, Tokyo, Japan

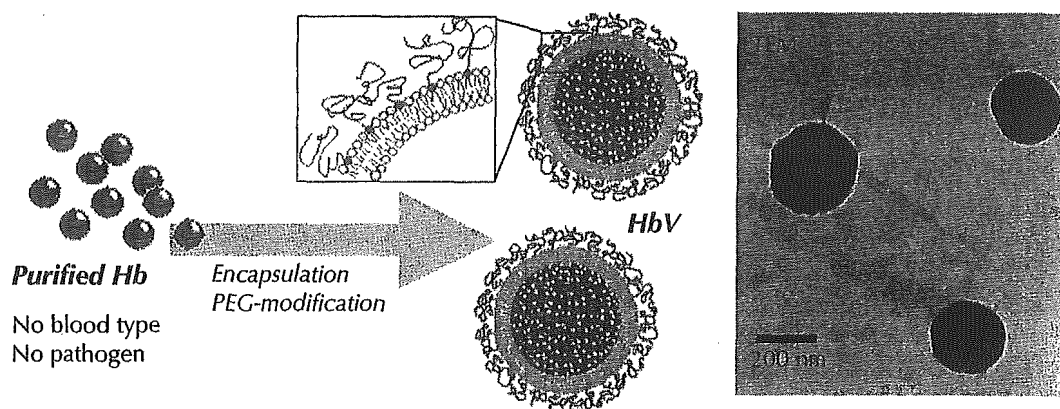
\*Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo,  
Japan

## IMPORTANCE OF CELLULAR STRUCTURE

Physicochemical analysis has revealed that the cellular structure of RBCs may not be effective for the facilitated O<sub>2</sub> releasing and binding of Hb molecules in comparison with a homogeneous Hb solution (Vandegriff and Olson, 1984; Page *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2003a); however, nature has selected this cellular structure during its evolution. Historically, Barcroft *et al.* insisted that the reasons for the Hb encapsulation in red blood cells were: (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 (Tsuchida *et al.*, 1995). Moreover, during the long history of the development of Hb-based O<sub>2</sub> carriers (HBOCs) many side effects of molecular Hb have become apparent, such as the dissociation of tetrameric Hb

subunits into two dimers ( $\alpha_2\beta_2 \rightarrow 2\alpha\beta$ ) that may induce renal toxicity, and entrapment of gaseous messenger molecules (NO and CO) inducing vasoconstriction, hypertension, reduced blood flow and tissue oxygenation at microcirculatory levels (Goda *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2000a), neurological disturbances, and the malfunctioning of the esophageal motor function (Murray *et al.*, 1995). These side effects of molecular Hb would imply the importance of the cellular structure.

The pioneering work of the Hb encapsulation was performed by Chang (1991) using a polymer membrane. After Bangham and Horne (1964) had reported that phospholipids assemble to form vesicles in aqueous media, and that they encapsulate water-soluble materials in their inner aqueous interior, it was quite reasonable to use such vesicles for the Hb encapsulation. Djordjevic and Miller (1977) prepared a liposome-encapsulated Hb (LEH) composed of phospholipids, cholesterol, fatty acid etc. The Naval Research Laboratory showed the remarkable progress of LEH (Rudolph



**Figure 44.1** Hb vesicles (HbV, diameter ca. 250 nm) are prepared from ultra-pure Hb obtained from outdated RBC. One particle contains about 30 000 Hb molecules. The surface of one HbV is modified with about 6000 polymer chains of PEG that ensure the dispersion stability of HbV during storage and during circulation in the bloodstream. The transmission electron micrograph (TEM) clearly demonstrates the well-regulated particle size and high Hb content within the vesicles. See color plate 22.

*et al.*, 1991). What we call Hb vesicles (HbV) with a high-efficiency production process and improved properties have been established by Tsuchida's group based on the nano-technologies of molecular assembly and precise analyses of the pharmacological and physiological aspects (Tsuchida, 1998; Figure 44.1). The *in vivo* studies of HbV have revealed O<sub>2</sub> transporting efficiency comparable to that of RBCs (Izumi *et al.*, 1996, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 2004a; Yoshizu *et al.*, 2004), safety in terms of blood compatibility (Ito *et al.*, 2001; Wakamoto *et al.*, 2001), the importance of the particle size and the cellular structure of HbV (Goda *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2000a), and prompt degradation in the reticuloendothelial system (Sakai *et al.*, 2001, 2004b, 2004c, 2004d), all of which make us confident about advancing to the further development of HbV. The joint collaborative partnership of academia (Waseda and Keio Universities), a biotechnology venture company (Oxygenix, Inc., Tokyo) and a corporation (Nipro Co., Osaka) is aiming for clinical trials of HbV within a few years.

In this chapter we scientifically summarize the characteristics of the preparation process of HbV based on the sciences of molecular assembly to induce their excellent performances. It should be emphasized that the components of HbV, lipids and Hb assemble to form a functional nanoparticle through secondary binding forces (hydrophobic interaction, Coulombic force, hydrogen bond, van der Waals force).

## PREPARATION OF HEMOGLOBIN VESICLES

### Virus inactivation and removal during hemoglobin purification

The primary advantage of artificial O<sub>2</sub> carriers should be no fear of infectious disease derived from human blood. In Japan, the donated blood is strictly inspected by the nucleic acid amplification test (NAT). However, it is necessary also to introduce procedures to inactivate and remove viruses during the process of Hb purification from outdated RBC in order to guarantee the utmost safety from infection, based on the unforgettable tragedy of HIV transmission due to the distribution of non-pasteurized plasma-derived products. In our purification process, virus inactivation was performed by pasteurization at 60°C for 10 hours – the same conditions for the pasteurization of human serum albumin (Sakai *et al.*, 1993; Fukutomi *et al.*, 2002). This process can be introduced by utilizing the stability of carbonylhemoglobin (HbCO). The thermograms of HbCO indicated a denaturation temperature of 78°C, which is much higher than that for oxyhemoglobin (64°C) (Sakai *et al.*, 2002a).

The virus inactivation efficiency was evaluated by the Hokkaido Red Cross Blood Center (Abe *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002). The Hb solution spiked with vesicular stomatitis virus (VSV) was treated at 60°C for 1 hour under a CO atmosphere. VSV was inactivated at > 6.0 log<sub>10</sub> without methHb

formation and denaturation. Some protein bands other than Hb disappeared on SDS-PAGE and IEF after the heat treatment. During pasteurization, all the other concomitant proteins are denatured and precipitated. As a result, we obtain an ultra-pure Hb solution. This high purity is essential for preventing membrane plugging during the subsequent ultrafiltration process to remove virus. The FDA requires two orthogonal steps of not only virus inactivation but also virus removal.

We tested the ultrafiltration of the HbCO solution to remove viruses with PLANOVA™-35N and -15N (P35N, P15N, Bemberg Microporous Membrane: BMM; Asahi Kasei Co.) (Naito *et al.*, 2002). The virus removal mechanism is by size exclusion through the capillary pores, and a depth filtration. The unit membrane, which has a network structure of capillaries and voids, is accumulated to form 150 layers. P35N and P15N have mean pore sizes of 35 nm and 15 nm, respectively. P35N is suitable for removing envelope-type viruses of which the size ranges from 40 nm to 100 nm, such as HIV, HCV etc., and P15N can be used to remove the non-envelope-type viruses with size of less than 40 nm, such as parvoviruses. The permeation flux and the permeated ratio of the HbCO solution ([Hb] = 5.6 g/dl) through P35N at 13°C were 36 (l/m<sup>2</sup> per hour) and almost 100 (per cent), respectively. Those through P15N were 15 (l/m<sup>2</sup> per hour) and 95 (per cent), respectively. Under the same conditions, a high removal efficiency of a bacteriophage,  $\phi \times 174$ , (>7.7 log) was confirmed. These results indicate that P15N is effective for the process of virus removal from Hb solution. We also confirmed the effectiveness of other virus removal ultrafiltration systems such as Viresolve (Millipore Co.).

The obtained purified HbCO solution can be very effectively concentrated to above 40 g/dl using an ultrafiltration process. After regulation of the electrolyte concentrations, this is supplied for the encapsulation procedure. The ligand of the resulting HbV, CO, is converted to O<sub>2</sub> by illuminating the liquid membrane of the HbV suspension with a visible light under flowing O<sub>2</sub> (Chung *et al.*, 1995).

Other groups have selected the way to preserve the well-organized but relatively unstable enzymatic systems originally present in RBCs, aiming at the prolonged stability of the ferrous state of Hb (Ogata *et al.*, 1997). The enzymatic system can partly be preserved with the compensation of insufficient virus removal or inactivation, but this cannot guarantee the utmost safety of

the resulting HBOCs. One advantage of HbV is that any reagent can be co-encapsulated in the vesicles. It has been confirmed that co-encapsulation of the appropriate amount of a reductant (such as glutathione or homocysteine) and active oxygen scavengers (such as catalase) effectively retards the metHb formation (Takeoka *et al.*, 1997, 2002; Sakai *et al.*, 2000a; 2004d; Teramura *et al.*, 2003). However, our recent idea is that the metHb formation may not be a serious problem in the emergency situation because HbV will be infused to bridge to the blood transfusion in a clinical setting.

### Encapsulation of concentrated Hb in HbV

The performance of Hb vesicles depends on the weight ratio of Hb to lipid ([Hb]/[lipids]), that is, the ability to carry more Hb with fewer vehicles made of lipids. This value is improved by lowering the number of bilayer membranes (lamellarity) of the vesicle and raising the concentration of Hb in the interior of the vesicle. We studied the optimal conditions for the Hb encapsulation using the extrusion method, and considered the behaviors of the Hb and lipid assemblies as a kind of polymer electrolyte (Takeoka *et al.*, 1993, 1994a, 1994b, 1996).

The maximum ([Hb]/[lipids]) ratio can be obtained at ~pH 7, which relates to the isoelectric point (pI) of Hb. The Hb molecule is negatively charged when the pH is above 7.0, and the electrostatic repulsion between Hb and the negatively charged bilayer membrane results in lower encapsulation efficiency. However, the lower pH enhances the Hb denaturation by too much interaction with the lipid bilayer membrane and metHb formation at a lower pH. Therefore, the physiological pH, 7.0–7.4, is optimal. It was also revealed that the higher ionic strength shields the repulsion between the negatively charged lipid bilayer membranes and increases the lamellarity.

The number of bilayer membranes decreases with increasing the microviscosity (decreased lipid mobility). Multilamellar vesicles are converted to smaller vesicles with a smaller lamellarity during the extrusion procedure. When the membrane fluidity is high, deformation of the vesicles during extrusion occurs more easily even for multilamellar vesicles, resulting in larger lamellarity in the final vesicles. Therefore, the use of lipids with a higher phase transition temperature is preferred. However, these lipids make extrusion more difficult, because a higher shear rate (high

extrusion pressure) is required. Based on this reasoning, mixed lipids contain dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) as the main component.

Based on the precise analysis of the characterization of the physicochemical properties of the components, the encapsulation efficiency of the Hb solution in a size-regulated phospholipid vesicle has been improved using an extrusion method (Sakai *et al.*, 1996; Sou *et al.*, 2003a). Mixed lipids (DPPC, cholesterol, 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[mono-methoxy poly(ethylene glycol)<sub>5000</sub>]) at a molar ratio of 5:5:1:0.033 were hydrated with a NaOH solution (7.6 mM) to obtain a polydispersed multilamellar vesicle dispersion (50 nm–30 μm in diameter). The polydispersed vesicles were converted to smaller vesicles having an average diameter of ~500 nm and with a relatively narrow size distribution by freeze-thawing at a lipid concentration of 2 g/dl and a cooling rate of –140°C/min. The lyophilized powder of the freeze-thawed vesicles was rehydrated into a concentrated Hb solution (40 g/dl) and retained the size and size distribution of the original vesicles. The resulting vesicle dispersion smoothly permeated through the membrane filters during extrusion. The average permeation rate of the freeze-thawed vesicles was ~30 times faster than that of the simple hydrated vesicles. During the extrusion process, the Hb solution was effectively encapsulated into the reconstructed vesicles with a diameter of 250 ± 20 nm, and the Hb/lipid ratio reached 1.7–1.8. This improvement of the Hb encapsulation procedure is a breakthrough for the scalability for commercialization.

## REGULATION OF OXYGEN AFFINITY

The O<sub>2</sub> affinity of purified Hb (expressed as *P*<sub>50</sub>, the O<sub>2</sub> tension at which Hb is half-saturated with O<sub>2</sub>) is about 14 mmHg, and Hb strongly binds O<sub>2</sub> and does not release O<sub>2</sub> at 40 mmHg (the partial pressure of mixed venous blood). Historically, it has been considered that the O<sub>2</sub> affinity should be regulated to a level similar to that of RBC, namely about 25–30 mmHg, using an allosteric effector or by a direct chemical modification of the Hb molecules. Theoretically, this allows sufficient O<sub>2</sub> unloading during blood microcirculation, as can be evaluated by the arteriovenous difference in the levels of O<sub>2</sub> saturation in accordance with an O<sub>2</sub> equilibrium curve. It has been

supposed that decreasing the O<sub>2</sub> affinity (increasing *P*<sub>50</sub>) will result in an increase in the O<sub>2</sub> unloading, which is supported by the result that RBC with a high *P*<sub>50</sub> shows an enhanced O<sub>2</sub> release for improved exercise capacity in a mouse model (Shirasawa *et al.*, 2003).

If this theory is correct, the *P*<sub>50</sub> of Hb in HbV should be equivalent to that of human red blood cells, i.e., 28 mmHg, or higher. Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) is co-encapsulated in HbV as an allosteric effector to regulate *P*<sub>50</sub> (Sakai *et al.*, 2000b). The main binding site of PLP is the N-terminal of the α- and β-chains and β-82 Lysine within the β-cleft, which is part of the binding site of natural allosteric effector, 2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG). The bound PLP retards the dissociation of the ionic linkage between the β-chains of Hb during conversion of deoxy to oxyHb in the same manner as does 2,3-DPG. Thus the O<sub>2</sub> affinity of Hb decreases in the presence of PLP. The *P*<sub>50</sub> of HbV can be regulated to 5–150 mmHg by co-encapsulating the appropriate amount of PLP or inositol hexaphosphate as an allosteric effector (Wang *et al.*, 1992). Equimolar PLP to Hb (PLP/Hb = 1/1 by mol) was co-encapsulated, and *P*<sub>50</sub> was regulated to 18 mmHg. When the molar ratio PLP/Hb was 3/1, *P*<sub>50</sub> was regulated to 32 mmHg. The O<sub>2</sub> affinities of HbV can be regulated quite easily without changing the other physical parameters, whereas in the case of the other modified Hb solutions their chemical structures determine their O<sub>2</sub> affinities and thus regulation is difficult. The appropriate O<sub>2</sub> affinities for O<sub>2</sub> carriers have not been yet completely decided; however, the easy regulation of the O<sub>2</sub> affinity may be useful in meeting the requirement for clinical indications such as oxygenation of ischemic tissues (Contaldo *et al.*, 2003).

## STORAGE STABILITY

Since Hb autoxidizes to form methHb and loses its O<sub>2</sub>-binding ability during storage as well as during blood circulation, the prevention of methHb formation is required. Some groups have reported a method of preserving the deoxygenated Hb in the liquid state (Kerwin *et al.*, 1999), using the well-known intrinsic characteristic of Hb that its oxidation rate in a solution is dependent on the O<sub>2</sub> partial pressure and deoxyHb is essentially not autoxidized at ambient temperature (Levy *et al.*, 1988). For the HbV, not only the inside Hb but also the cellular structure has to be physically