

conducted a longer period of observation (two weeks) after moderate and clinically relevant isovolemic exchange transfusion of a 40% estimated blood volume with HbV suspended in a 5-g/dl rHSA solution [12]. All rats survived and increased their body weights until their intended sacrifice. We undertook plasma biochemical, hematological and histopathological examinations, which showed no irreversible changes.

The ability of HbV to restore systemic conditions after hemorrhagic shock was evaluated in anesthetized Wistar rats for 6 h after resuscitation [13]. The HbV was suspended in a 5-g/dl rHSA solution (HbV/rHSA) at an Hb concentration of 8.6 g/dl. Shock was induced by a 50% blood withdrawal. The rats showed hypotension and considerable metabolic acidosis and hyperventilation. After 15 min, they received HbV/rHSA, shed autologous blood (SAB), washed homologous red blood cells (wRBC) suspended in rHSA (wRBC/rHSA, [Hb] = 8.6 g/dl), or rHSA alone. The HbV/rHSA group restored mean arterial pressure to 93 ± 8 mm Hg at 1 h, similar to the SAB group (92 ± 9 mm Hg), which was markedly higher than that of the rHSA group (74 ± 9 mm Hg). No remarkable difference in the blood gas variables pertained between the resuscitated groups. However, two of eight rats in the rHSA group died before 6 h. After 6 h, the rHSA group showed considerable ischemic changes in the right cerebral hemisphere relating to the ligation of the right carotid artery followed by cannulation, whereas the HbV/rHSA, SAB, and wRBC/rHSA groups showed less change. These results indicate that HbV suspended in albumin provides restoration from hemorrhagic shock that is comparable to that using shed autologous blood [13,14]. We are now studying a similar resuscitation study using beagles, confirming the effectiveness of HbV as a resuscitative fluid.

One characteristic of HbV is that the oxygen affinity of HbV can be regulated by changing the amount of co-encapsulated allosteric effector without changing other physicochemical properties. This provides a unique opportunity to explore new clinical indications: HbV with a high O_2 affinity (low P_{50}) can retain O_2 at an upper flow in the micro circulation and release O_2 at a hypoxic tissue where the blood flow is significantly reduced [15,16]. Actually, HbV with a high O_2 affinity improved oxygenation of an ischemic skin flap [17,18]; the results imply the possibility of further application of HbV to other ischemic diseases such as myocardial and brain infarction and stroke.

3. IN VIVO SAFETY OF HbV

We examined the safety profile of HbV with regard to microvascular responses, pharmacokinetics, influence on RES, influence on clinical measurements, and daily repeated infusion.

We observed the responses to the infusion of intra-molecularly cross-linked Hb (XLHb) and HbV into conscious hamsters. The XLHb (7 nm diameter) showed a significant increase in hypertension equal to 35 mmHg with simultaneous resistance caused by vasoconstriction of the artery equal to 75% of the baseline levels [19]. On the other hand, HbV at 250 nm showed minimal change. The small acellular XLHb is dispersed homogeneously in the plasma; it diffuses through the endothelium layer of the vascular wall and reaches the smooth muscle. The XLHb presumably traps nitric oxide (NO) as an endothelium-derived relaxation factor. Subsequently, it induces vasoconstriction and hypertension. On the other hand, the large HbV should stay in the lumen and does not induce vasoconstriction. Several mechanisms are proposed for Hb-induced vasoconstriction. These include NO-binding, excess O₂ supply, reduced shear stress, and the presence of a Hb recognition site on the endothelium. However, it is apparent that Hb-encapsulation shields the side effects of acellular Hbs.

The vascular wall of the sinusoid in hepatic microcirculation has many pores, called fenestrations, of ca. 100 nm diameter. The small Hb molecules with a diameter of only 7 nm extravasate through the fenestrated endothelium and reach the space of Disse. On the other hand, HbV particles, which are larger than the pores, do not extravasate. The heme of extravasated Hb is metabolized excessively by hemoxygenase-2 in hepatocyte to produce CO and bilirubin. Even though CO acts as a vasorelaxation factor in the liver, the excess amount of Hb binds CO rapidly, engendering vasoconstriction and increased vascular resistance. On the other hand, HbV (250 nm diameter) is sufficiently large to remain in the sinusoid; the vascular resistance is maintained [20].

These observations indicate the importance of cellular structure and particle diameter of HbV from the viewpoint of hemodynamics. However, the particles in this size range (250 nm) finally distribute to so-called reticuloendothelial system. Circulation persistence was measured monitoring the concentration of radioisotope-labeled HbV [21]. The circulation half-life is dose-dependent; it was 32 h in rats when the dose rate was 14 ml/kg. Gamma camera images showed the distribution of HbV mainly in the liver, spleen and bone marrow. Transmission electron microscopy (TEM) showed that the spleen 1 day after infusion of HbV demonstrated the presence of HbV particles in the phagosomes of the macrophages [22]. However, the HbV structure cannot be observed after 7 days. A pathological technique using anti-human Hb antibody showed the clearance of human Hb derived from HbV in one week.

One issue of the Hb-based O₂ carriers is that they have a marked influence on clinical laboratory tests. They remain in the plasma phase in hematocrit capillaries after centrifugation of blood samples and

interfere with colorimetric and turbidimetric measurements. In contrast, HbV is easily removable from blood plasma, either by ultracentrifugation or centrifugation in the presence of a high-molecular-weight dextran to enhance precipitation of HbV. A clear supernatant is obtained for accurate analyses [23]. This is an advantage of HbV over acellular Hb solutions. Accordingly, we examined the influence on organ functions by serum clinical laboratory tests after bolus infusion and daily repeated infusions of HbV [24,25]. Albumin, ALT, AST, and LDH, which reflect the liver function, were within normal ranges. Concentrations of bilirubin and ferric ion were maintained at a low level. The lipid concentration changed transiently, but returned to its original level in 2 wk. These results indicate that the membrane components of HbV, once they reappear from RES, are metabolized on the physiological pathway.

4. SUMMARY

Results showing the safety and efficacy of HbV have encouraged us to move forward. The joint collaboration partnership of academia (Waseda and Keio Universities), a biotech venture company (Oxygenix, Co. Ltd., Tokyo) and one corporation (Nipro Corp., Osaka) are striving to achieve clinical trials of HbV within a few years. Considerable efforts have been undertaken to produce HbV with a facility of GMP standard, and to start preclinical and, ultimately, clinical trials.

REFERENCES

1. Kobayashi, K., Tsuchida, E., Horinouchi, H. (2005). *Artificial Oxygen Carriers, Its Front Line*, Springer-Verlag: Tokyo.
2. Chang, T.M.S. (2005). Therapeutic applications of polymeric artificial cells. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 221–235.
3. Sakai, H., Tomiyama, K., Sou, K., Takeoka, S., Tsuchida, E. (2000). Poly (ethyleneglycol)-conjugation and deoxygenation enable long term preservation of hemoglobin vesicles as oxygen carriers. *Bioconjugate Chem.* 11: 425–432.
4. Djordjevich, L., Mayoral, J., Miller, I.F., Ivankovich, A.D. (1987). Cardio-respiratory effects of exchanging transfusions with synthetic erythrocytes in rats. *Crit. Care. Med.* 15: 318–323.
5. Izumi, Y., Sakai, H., Hamada, K., Takeoka, S., Yamahata, T., Kato, R., Nishide, H., Tsuchida, E., Kobayashi, K. (1996). 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: 1869–1873.
6. Rudolph, A.S., Klipper, R.W., Goins, B., Phillips, W.T. (1991). In vivo biodistribution of a radiolabeled blood substitute: ^{99m}Tc -labeled

- liposome-encapsulated hemoglobin in an anesthetized rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10976–10980.
7. Ito, T., Fujihara, M., Abe, H., Yamaguchi, M., Wakamoto, S., Takeoka, S., Sakai, H., Tsuchida, E., Ikeda, H., Ikebuchi, K. (2001). Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced responses of polymorphonuclear neutrophils in vitro. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **29**: 427–437.
 8. Wakamoto, S., Fujihara, M., Abe, H., Yamaguchi, M., Azuma, H., Ikeda, H., Takeoka, S., Tsuchida, E. (2005). Effects of hemoglobin vesicles on resting and agonist-stimulated human platelets in vitro. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **33**: 101–111.
 9. Izumi, Y., Sakai, H., Kose, T., Hamada, K., Takeoka, S., Yoshizu, A., Horinouchi, H., Kato, R., Nishide, H., Tsuchida, E., Kobayashi, K. (1997). Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model. *ASAIO J.* **43**: 289–297.
 10. Kobayashi, K., Izumi, Y., Yoshizu, A., Horinouchi, H., Park, S.I., Sakai, H., Takeoka, S., Nishide, H., Tsuchida, E. (1997). The oxygen carrying capability of hemoglobin vesicles evaluated in rat exchange transfusion models. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **25**: 357–366.
 11. Sakai, H., Takeoka, S., Park, S.I., Kose, T., Nishide, H., Izumi, Y., Yoshizu, A., Kobayashi, K., Tsuchida, E. (1997). Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem.* **8**: 23–30.
 12. Sakai, H., Horinouchi, H., Yamamoto, M., Ikeda, E., Takeoka, S., Takaori, M., Tsuchida, E., Kobayashi, K. (2006). 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* **46**: 339–347.
 13. Sakai, H., Masada, Y., Horinouchi, H., Yamamoto, M., Ikeda, E., Takeoka, S., Kobayashi, K., Tsuchida, E. (2004). Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit. Care Med.* **32**: 539–545.
 14. Yoshizu, A., Izumi, Y., Park, S., Sakai, H., Takeoka, S., Horinouchi, H., Ikeda, E., Tsuchida, E., Kobayashi, K. (2004). Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier Hemoglobin Vesicle (HbV) maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma TNF α . *ASAIO J.* **50**: 458–463.
 15. Sakai, H., Cabrales, P., Tsai, A.G., Tsuchida, E., Intaglietta, M. (2005). Oxygen release from low and normal P₅₀ Hb vesicles in transiently occluded arterioles of the hamster window model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**: H2897–H2903.
 16. Cabrales, P., Sakai, H., Tsai, A.G., Takeoka, S., Tsuchida, E., Intaglietta, M. (2005). Oxygen transport by low and normal oxygen affinity hemoglobin vesicles in extreme hemodilution. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**: H1885–H1892.

ポリ（エチレングリコール）修飾アルブミン-ヘム： 酸素輸送血漿増量剤としての溶液物性と機能

Poly(ethylene glycol)-Conjugated Albumin-Heme: Solution Properties and Functions as O₂-Carrying Plasma Expander

小松晃之⁽¹⁾, 黄 宇彬⁽¹⁾, 王 榮民⁽¹⁾, 中川晶人⁽¹⁾, 山本尚志^(2,3), 堀之内宏久⁽³⁾, 小林紘一⁽³⁾, 土田英俊⁽¹⁾

Teruyuki Komatsu⁽¹⁾, Yubin Huang⁽¹⁾, Rong-Min Wang⁽¹⁾, Akito Nakagawa⁽¹⁾, Hisashi Yamamoto^(2,3),

Hirohisa Horinouchi⁽³⁾, Koichi Kobayashi⁽³⁾, Eishun Tsuchida⁽¹⁾

和文抄録

組換えヒト血清アルブミン（HSA）にテトラ（*o*-アミドフェニル）ポルフィリン鉄（Fe4PまたはFe3P）を包接したアルブミン-ヘム複合体（HSA-FeXP）は、生理条件下で酸素を可逆的に結合解離できる合成ヘム蛋白質である。我々はその分子表面にポリ（エチレングリコール）（PEG）鎖を共有結合で導入した新しい人工酸素運搬体“PEG修飾HSA-FeXP”を合成し、その構造、物理化学的特徴、酸素結合能、生体内酸素輸送能の詳細を明らかにした。本稿では、PEG修飾アルブミン-ヘムの最新の話題を紹介したい。PEG鎖の導入は、リシンのアミノ基を2-イミノチオラン（IMT）でチオール基へ変換後、そこへ α -マレイミド- ω -メトキシPEG [PEG_{MY}, 分子量 2 kDa (PEG_{M2}) または 5 kDa (PEG_{M5})] を反応させる方法、もしくは α -スクシンイミド- ω -メトキシPEG [PEG_{SY}, 分子量 2kDa (PEG_{S2}) または 5 kDa (PEG_{S5})] をリシンのアミノ基と直接反応させる方法により行った。MALDI-TOF MSには明確な分子イオンピークが現れ、その質量数からPEG鎖の結合本数を決定した。PEG_{MY} (HSA-FeXP) の場合、残存するチオール基の定量からも平均PEG結合本数が算出できる。PEG (2 kDa) で修飾したHSA-FeXP溶液（リン酸緩衝生理食塩水, [HSA]: 5 g/dL）の溶液粘度、コロイド浸透圧は未修飾体と同等であったが、PEG (5 kDa) 修飾体の値は顕著に増大した。PEG鎖の導入はFeXPの酸素結合速度を低下させる一方、酸素錯体の安定度を向上させた。ラットへPEG_{MY} (HSA-FeXP) 溶液を投与した後のFeXPの血中滞留時間は13–16 hrであった。また、ラット脱血ショックモデルを用いた蘇生試験では、HSA投与対照群に比べ、生存時間、呼吸循環器系パラメーター、組織酸素分圧、血液ガスパラメータに回復効果が見られた。HSA-FeXPの分子表面をPEG鎖で修飾すると、in vitro, in vivoにおける酸素運搬能が改善されることが明らかとなった。PEG_{MY} (HSA-FeXP) 溶液は、臨床利用可能な酸素輸送血漿増量剤として期待される。

Abstract

Albumin-heme hybrid composed of human serum albumin (HSA) incorporating tetrakis (*o*-amidophenyl)porphinatoiron(II) (Fe4P or Fe3P) (HSA-FeXP) is a unique artificial hemoprotein which can reversibly bind and release oxygen (O₂) under physiological conditions. We have introduced poly(ethylene glycol) (PEG) chains into the molecular surface of albumin-heme by covalently bond to produce a new artificial O₂-carrier "PEG conjugated albumin-heme", and clarified its structure, physicochemical properties, O₂-binding properties and O₂-transporting ability in vivo. This review describes the latest results from our research on PEG conjugated HSA-FeXP. The HSA-FeXP has been modified by maleimide- or succinimide-terminated PEG. 2-Iminothiolane reacted with the amino groups of Lys to create active thiol groups, which bind to α -maleimide- ω -methoxy PEG [Mw: 2-kDa (PEG_{M2}), 5-kDa (PEG_{M5})]. On the other hand, α -succinimidyl- ω -methoxy PEG [Mw: 2-kDa (PEG_{S2}), 5-kDa (PEG_{S5})] directly binds to Lys residues. MALDI-TOF MS of the PEG conjugated HSA-FeXP showed distinct molecular ion peaks, which provide an accurate number of the PEG chains. In the case of PEG_{MY}(HSA-FeXP), the spectroscopic assay of the thiol groups

(1) 早稲田大学理工学総合研究センター, 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1, Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555

(2) ニプロ株式会社医薬品研究所, 〒525-0055 滋賀県草津市野地町3023

(3) 慶応義塾大学医学部呼吸器外科, 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

論文受付 2006年6月19日 論文受理 2006年7月20日

also provided mean of the binding numbers of the polymers. The viscosity and colloid osmotic pressures of the 2-kDa PEG-conjugates (phosphate buffered saline solution, [HSA] = 5 g dL⁻¹) were almost the same as that of the non-modified one, whereas the 5-kDa PEG binding increased the rheological parameters. The presence of flexible polymers on the HSA surface retarded the association reaction of O₂ to FeXP, and stabilized the oxygenated complex. Furthermore, PEG_{MY}(HSA-FeXP) exhibited a long circulation lifetime of FeXP in rats (13–16 h). The physiological responses to an exchange transfusion with PEG_{M26}(HSA-Fe4P) into an acute anemia rat model showed significant recovery effects on survival time, circulation parameters, blood parameters and muscle tissue oxygen partial pressure. On the basis of these results, it can be concluded that the surface modification of HSA-FeXP by PEG has improved its comprehensive O₂-transporting ability. In particular the PEG_{MY}(HSA-FeXP) solution could be a promising material for entirely synthetic O₂-carrying plasma expander as a red cell substitute.

Keywords

Poly (ethylene glycol), human serum albumin, albumin-heme, oxygen-carrier, plasma expander, red cell substitute

1. はじめに

ポリ (エチレングリコール) (PEG) は、ペプチド、蛋白質、酵素、リン脂質ベシクルの表面修飾剤として一般に広く利用され、様々な付加価値を与えることが知られている。血中半減期の延長、抗原性の回避のみならず、面白いところでは有機溶媒に対する溶解性の付与や耐熱性の向上などがある¹⁴⁾。人工酸素運搬体としてのPEG修飾ヘモグロビン (Hb) の開発も継続されており⁵⁸⁾、現在、最適化された製剤について臨床試験が進行している。他方、ヒト血清アルブミン (HSA) は、血漿中に高濃度 (4–5 g/dL) に存在する多機能蛋白質である⁹⁾。我々は、テトラ (*o*-アミドフェニル) ポルフィリン鉄 (II) 誘導体 (Fe4PまたはFe3P, Chart 1) をHSAに包接させたアルブミン-ヘム複合体 (HSA-FeXP) が、生理条件下 (pH 7.4, 37°C) で酸素を可逆的に吸脱着できることを見出し¹⁰⁾、出血ショックモデルラットへの投与実験から、HSA-Fe4Pの安全性と生体内酸素輸送能を明らかにしてきている¹¹⁾。HSA-FeXPに残された唯一の課題は、FeXPがHSAの疎水ポケットに非共有結合で包接されているため (結合定数K: 10⁴–10⁶ M⁻¹)、血中へ投与すると蛋白質骨格から解離し易いことにある。天然のヘム (プロトポルフィリンIX (FePPIX) 鉄) もHSAに取り込まれるが (K値はFeXPの10²–10⁴倍と高い)¹²⁾、血液循環系では2.5–3.6時間の半減期でHSAから離脱する¹³⁾。そこで我々は、HSA-FeXPの分子表面をPEG鎖で修飾すれば、FeXPの解離が抑制され、酸素運搬能を長時間持続させることができるのではないかと考えた。HSAは血漿蛋白質として古くから研究されているものの、PEG修飾の化学についてはあまり知られていない。種々の薬物がHSAに包接されて体内循環することは周知の事実であり⁹⁾、PEG修飾によりHSAに結合した薬物の血中濃度をコントロールすることができれば、薬効制御の点からも大変有効な方法論になろう。

本稿では、PEG修飾HSA-FeXP [PEG (HSA-FeXP)] の構造、物理化学的特徴、酸素結合能、生体内酸素輸送能に関する著者らの最近の成果を概説する。PEG鎖による表面修飾は、HSA-FeXPの溶液粘度、コロイド浸透圧 (COP)、酸素結合挙動およびFeXPの血中滞留時間に大きな影響を及ぼす。PEG修飾HSA-FeXPは、臨床利用可能な赤血球代替物または酸素治療

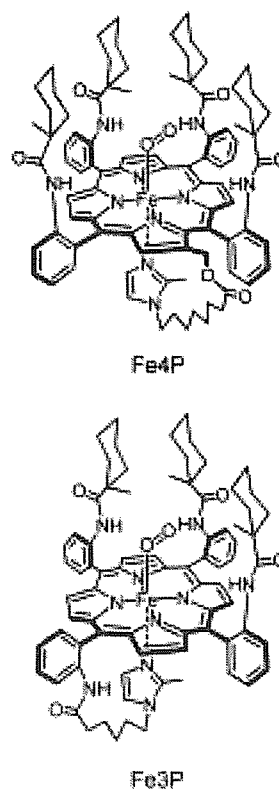


Chart 1. Structures of O₂-adduct complexes of tetrakis (*o*-amidophenyl) porphyrinatoiron (II).

薬としてきわめて有用な製剤として期待される。

2. PEG修飾アルブミン-ヘムの調製と構造

HSA-FeXPは片末端に活性基を有するマレイミドPEGまたはスクシンイミドPEGにより、室温で簡便に表面修飾することができる。IMTは定量的にリシンのアミノ基と反応し活性チオール基を生成、これがα-マレイミド-ω-メトキシPEG (PEG_{M2}またはPEG_{M5}) と反応する (Fig. 1.)。この2段階反応は再現性が良く、副生成物もない。一方、α-スクシンイミド-ω-メトキシ

PEG (PEG₃₂またはPEG₅₅) は、リシンのアミノ基と直接反応する。

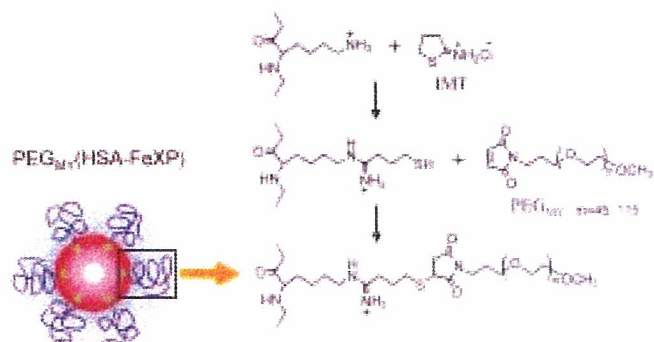


Fig. 1. Two-step reaction schemes of IMT and maleimide-PEG (PEG_{MY}) with HSA-FeXP.

PEG_{M5}(HSA-Fe4P) (仕込み比：[IMT]/[HSA-Fe4P]=15/1 (mol/mol)) のMALDI-TOF MSを測定すると、85, 90, 95, 101, 106 kDaに5つの明確なピークが現れた (Fig. 2.A). 未反応のHSA-Fe4Pは存在せず、各質量数の差が5.25 kDa間隔であることから、HSA-Fe4PにPEG_{M5}が間違いなく共有結合しており、それぞれのピークは異なるPEG結合本数を有するPEG_{M5}(HSA-Fe4P)の分子イオンに相当すると考えられた。ここで注意しなければならないことは、各質量数にFe4Pの分子量が含まれるかどうかである。HSA-Fe4PのMALDI-TOF MS測定では、HSA由来のピーク (66.5 kDa) のみが観測され、HSAに包接されたFe4Pは、イオン化の途中で蛋白質内部から解離してしまうことがわかっている (10a)。我々は、HSA-FeXPにおけるPEG鎖の平均結合本数をHSAとチオール基の定量分析から算出する方法を確立した。一般に、HSA濃度は280 nmの吸光度、またはブロムクレゾールグリーン法により決定できるが¹⁵⁾、それらの方法はPEG鎖で表面修飾した場合、少なからず阻害されるものと予想される。そこで、HSA濃度の定量にCDスペクトル測定を利用した。HSA溶液とPEG修飾HSA溶液のCDスペクトルを比較したところ、HSA部由来のモル楕円率 ($\epsilon_{208}=1.9 \times 10^4 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) がPEG鎖結合の前後で変わらないことを見出した。つまり、PEG修飾HSA-FeXPのHSA濃度は、208 nmにおけるCD強度から正確に決定できるのである。一方、蛋白質上のチオール基は2,2'-DTPを用いたジスルフィド交換反応で定量することができる¹⁶⁾。これら2つの方法を組合せることにより、HSA-FeXPにおけるチオール基数の算出が可能となった。IMTと反応 ([IMT]/[HSA-Fe4P] = 15 (mol/mol)) をさせた直後のHSA 1分子当たりのチオール基平均数は6.7であるが、PEG_{M5}との反応後 ([PEG]/[HSA-Fe4P] = 20 (mol/mol)) は0.6に減少した (Table 1.)。つまり、平均6.1個のチオール基がPEG_{M5}と反応していることになる。MSのピーク強度から算出したPEG_{M5}(HSA-Fe4P) の平均質量数 (95 kDa) からPEG鎖6本分の分子量 (5 kDa×6 = 30 kDa) を差し引くと65 kDaとなり、これはHSA単独の分子量に等しい。以上の結果から、

MALDI-TOF MSで観測された分子イオンピークにはFeXPの分子量は含まれないことがわかった。以下、分子表面に5 kDaのマレイミドPEGが平均6本結合したHSA-Fe4PをPEG_{M5-6}(HSA-Fe4P) と略記する。

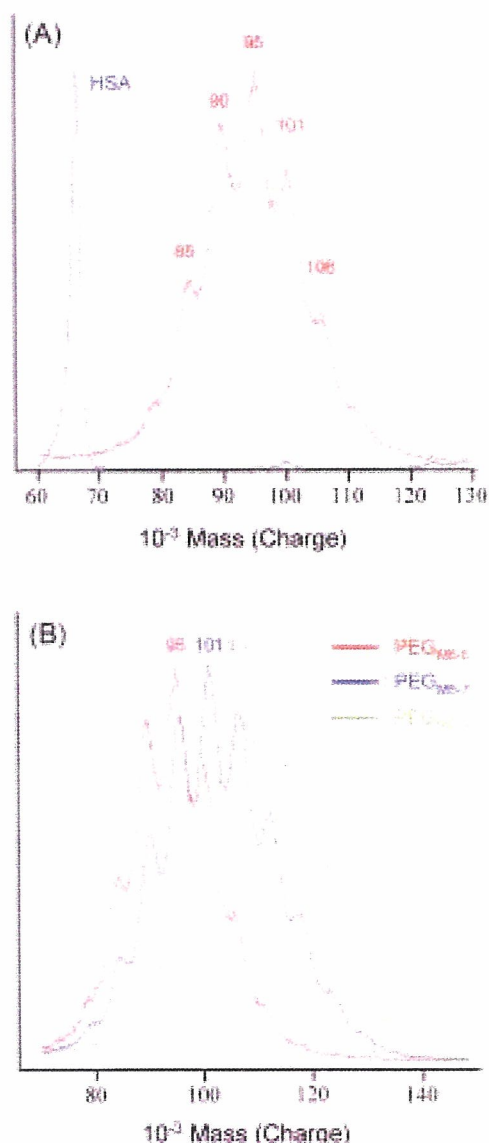


Fig. 2. MALDI-TOF MS of (A) HSA and PEG_{M5-6}(HSA-Fe4P) and (B) PEG_{M5}(HSA-Fe4P) prepared in different [IMT]/[HSA-Fe4P] ratios of 15 (red), 20 (blue) and 30 (green) (mol/mol).

Table 1. The mean of thiol groups per HSA-Fe4P molecule and binding number of the PEG chains.

PEG	[IMT]/[HSA-Fe4P] mol/mol	Thiol groups per HSA after IMT addition (A)	Thiol groups per HSA after PEG binding (B)	Decreased thiol groups(B)-(A) ^a	Averaged PEG number from MS
PEG _{M2}	10	5.6	0.5	5.1	4.6
	15	6.6	0.9	5.7	5.7
	20	8.3	1.1	7.2	6.6
PEG _{M5}	15	6.7	0.6	6.1	5.9
	20	8.0	0.9	7.1	7.2
	30	9.3	1.1	8.2	8.3

^aThis number corresponds to the binding numbers of PEG_{Mn} on the protein surface.

HSA-Fe4Pに対するPEG_{M5}の結合本数は、HSA-Fe4PとIMTの仕込み比により調節できる。IMT量を増加させるに従い、PEG_{M5}(HSA-Fe4P)の最大分子イオンピークは高質量数側95→101→107 kDaへと移行した。全体のピークパターン（分子量分布）に変化が見られないことは興味深い（Fig. 2.B）。分子イオンピーク強度から推定したHSA当りのPEG結合本数は、チオール基の定量から算出した値とよく一致した（Table 1.）。

一方、PEG_{M2}(HSA-Fe4P)の場合、PEG_{M5}修飾体に比べ各ピーク質量数の差が小さいため、単一ブロードピークとして観測される。この場合も仕込んだIMT量の増加により、最大ピーク位置は高質量数側へと移行した（Fig. 3, Table 1.）。

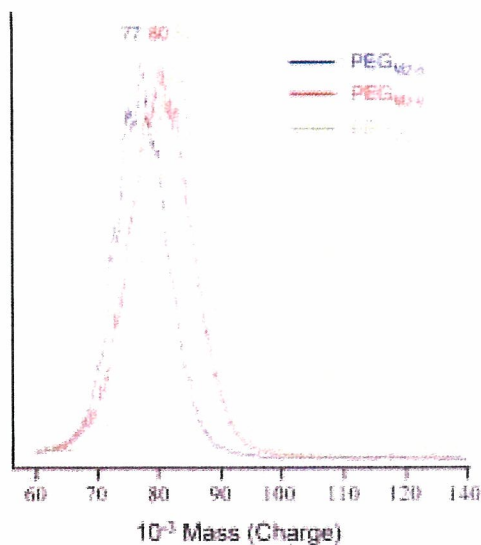


Fig. 3. MALDI-TOF MS of PEG_{M2}(HSA-Fe4P) prepared in different [IMT]/[HSA-Fe4P] ratios of 10 (blue), 15 (red) and 20 (green) (mol/mol).

スクシンイミドPEGで修飾したPEG_{Sy}(HSA-Fe4P)のMALDI-TOF MSも、PEG_{Mn}(HSA-Fe4P)と同様なピークパ

ターンを示した。PEG_{S5}(5 kDa)の仕込み比を増やすと([PEG_{S5}]/[HSA-Fe4P] = 10, 20, 30 (mol/mol)), 蛋白質当りのPEG_{S5}平均結合本数は4→5→6と上昇した（平均結合本数はMSの平均質量数からHSAの分子量を差し引き、PEGの分子量で除した値とした）。しかし、PEG_{S2}(2 kDa)の場合、仕込み量([PEG_{S5}]/[HSA-Fe4P] = 10–20 (mol/mol))に関係なく、結合本数は常に6であった。これはスクシンイミド基の一部が水中で加水分解しているためと推測される。分子表面に2 kDaのスクシンイミドPEGが平均6本結合したHSA-Fe4PをPEG_{S2-6}(HSA-Fe4P)と略記する。

また、CDスペクトルから定量した[HSA]および、ICPから定量した[FeXP]の値から、PEG修飾の前後でHSA/FeXPのモル比4 (mol/mol)が変わらないことを確認した。

3. 溶液物性

PEG (2 kDa)で修飾したPEG_{M2}(HSA-FeXP), PEG_{S2}(HSA-Fe4P) (PBS溶液, [HSA]: 5 g/dL, pH 7.4)の溶液粘度とCOPはPEG鎖の結合本数に関係なく、未修飾体とほぼ同じ値であった。これに対しPEG (5 kDa)で修飾したPEG_{M5}(HSA-FeXP), PEG_{S5}(HSA-Fe4P) (PBS溶液, [HSA]: 5 g/dL, pH 7.4)は、HSAやHSA-FeXPに比べ高粘度 (2.30–2.34 (ずり速度230 s⁻¹)), 高COP値 (45–65 mmHg)を示した。輸血代替を目的とした場合、COPはヒト血液に等しいことが望ましいが、血漿増量剤としての効果を強調するためには、生理的条件より幾分高いCOPにすることも有効であろう¹⁷⁾。血液粘度の維持が微小循環系におけるずり応力の保全に重要な役割を果していることも提唱されている¹⁸⁾。溶液粘度とCOPの値が表面に導入するPEG鎖の分子量 (2 kDa, 5 kDa)で制御できる特徴は、PEG修飾HSA-FeXPの大きな利点である。

4. 酸素結合能

窒素雰囲気下におけるPEG_{M2}(HSA-Fe4P)の紫外可視吸収スペクトルは、λ_{max}: 441, 537, 563 nmを示し（Fig. 4.）、これはFe4Pが2-メチルイミダゾリル基を分子内配位して、Fe (II) 5

Table 2. Solution properties of PEG-conjugated HSA-FeXP solutions at 37°C (pH 7.4, [FeXP]= 3 mM).

PEG	Density(g/cm ³)	Viscosity(cP)	COP(mmHg)
PEG _{M2-5} (HSA-Fe4P)	1.01	1.08	22
PEG _{M2-6} (HSA-Fe4P)	1.01	1.14	27
PEG _{M2-7} (HSA-Fe4P)	1.01	1.17	28
PEG _{M2-6} (HSA-Fe3P)	1.01	1.14	26
PEG _{M5-6} (HSA-Fe4P)	1.01	2.34	65
PEG _{S2-6} (HSA-Fe4P)	1.01	1.14	22
PEG _{S5-6} (HSA-Fe4P)	1.01	2.30	45
HSA-Fe4P	1.01	1.05	21
HSA	1.01	1.00	21

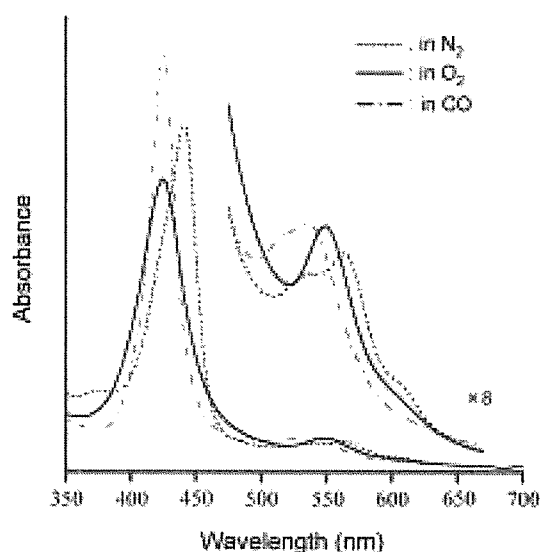


Fig. 4. UV-vis. absorption spectral change of PEG_{M2-6} (HSA-Fe4P) in PBS solution (pH 7.4).

配位高スピン錯体を形成していることを示している (10b,c,19). ヘム鉄の配位構造としては、ヘモグロビン、ミオグロビンのデオキシ体に相当するが、スペクトルパターンや $\lambda_{\max}$ 値 (434, 557 nm)²⁰⁾ が異なるのは、活性中心であるポルフィリンの骨格構造が異なるためである。そこへ酸素を通気すると、スペクトルは速やかに酸素錯体型へ移行し ($\lambda_{\max}$: 424, 550 nm) (10b,c,20), 酸素結合解離は酸素分圧に応答して可逆的に生じた。また、一酸化炭素を通気すると、PEG_{M2} (HSA-FeP) は安定な一酸化炭素錯体を形成した ($\lambda_{\max}$: 425, 535 nm). 全てのPEG修飾HSA-FeXP溶液は同様なスペクトル変化を示した。

レーザーフラッシュホトリシス後の吸光度変化から、PEG修

飾HSA-FeXPの酸素結合速度定数 (k_{on}) を決定した²⁰⁾. HSA-FeXPの酸素結合反応はFeXP近傍の分子環境 (アミノ酸残基による立体障害や空間の極性) に影響を受ける結果、速い過程 (結合速度定数 k_{on} (fast)) と遅い過程 (結合速度定数 k_{on} (slow)) の2成分から構成される (10c-e). このHSA-FeXPに見られる特性は、PEG修飾後も変わることなく、全ての酸素結合過程は二相性の反応として観測された。興味深いことに、PEG修飾HSA-FeXPの k_{on} (fast) は、対応するHSA-FeXPの1/1.9–1/3.3低い値を示した。HSA表面の柔軟なPEG鎖が、酸素分子の拡散を抑えているためと考えられる。

PEG修飾HSA-FeXPの $P_{1/2}$ [$K(O_2)^{-1}$] は、 O_2/N_2 滴定による紫外可視吸収スペクトル変化から決定した (Table 3). PEG修飾HSA-FeXPの $P_{1/2}$ 値は、もとの未修飾体と同等であり、FeXPの酸素配位平衡はPEG鎖に影響を受けないことがわかった。速度論的には、酸素の結合速度と解離速度がいずれも減少しているためと説明できる (10c). 一方、PEG修飾によりFeXO₂錯体のプロトン酸化は抑制され、酸素錯体の半減期 [$\tau_{1/2}(O_2)$] は延長された。とりわけ、PEG_{M5-6} (HSA-Fe4P) O_2 が最も長い $\tau_{1/2}(O_2)$ (16 hr, 37°C) を示し、この値は天然ヘム蛋白質であるミオグロビン (12 hr, pH 7, 37°C) の値をも上回った²¹⁾.

5. 血中滞留時間 (ラット)

PEG_{MY-6} (HSA-FeXP) およびPEG_{SY-6} (HSA-Fe4P) 溶液をラットへ投与 (20%循環血液量相当) し、FeXPの血中残存率を測定した (Fig. 5). PEG_{MY} (HSA-FeXP) 投与後のFeXPの消失過程は一次反応に従い、血中半減期はPEGの分子量、FeXPの構造に関わらず12.9–15.8 hrと長かった²²⁾. PEG鎖による表面修飾が、予想通りFeXPの解離を抑制しているためと推測される。

他方、PEG_{SY} (HSA-Fe4P) 投与後のFe4Pの減衰曲線は二相性を示し、 $\tau_{1/2}$ 値は1.5–2.1 hrに留まった。これら半減期の違いは、表面電荷およびPEG結合位置の相違によるものと考えら

Table 3. O₂-Binding parameters of PEG-conjugated HSA-FeXP solution at 25°C (pH 7.4).

System	k_{on} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		k_{off} (ms^{-1})		$P_{1/2}^a$ (Torr)	$\tau_{1/2}$ (h) at 37°C
	fast	slow	fast	slow		
PEG _{M2-5} (HSA-Fe4P)	11	5.8	0.16	0.08	11 (38)	13
PEG _{M2-6} (HSA-Fe4P)	12	4.6	0.17	0.07	11 (32)	12
PEG _{M2-7} (HSA-Fe4P)	9.3	4.7	0.16	0.08	13 (35)	12
PEG _{M2-6} (HSA-Fe3P)	15	4.2	0.52	0.14	26 (41)	8
PEG _{M5-6} (HSA-Fe4P)	12	6.2	0.17	0.09	11 (31)	16
PEG _{S2-6} (HSA-Fe4P)	10	4.3	0.14	0.06	11 (36)	13
PEG _{S5-6} (HSA-Fe4P)	12	5.5	0.25	0.11	16 (32)	18
HSA-Fe4P	31	7.3	0.53	0.13	13 (34)	9
HSA-Fe3P	29	4.4	1.1	0.16	22 (45)	4

^aThe numbers in parenthesis are $P_{1/2}$ (Torr) at 37°C.

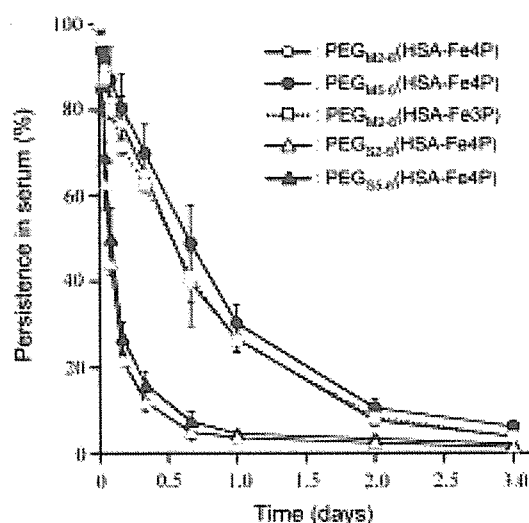


Fig. 5. Persistence of FeXP in serum after administration of PEG conjugated HSA-FeXP into Wistar rats. All values are mean $\pm$ S.D. (n=4).

れる。現在、FeXPを含まないPEG修飾HSAの血中滞留時間を観測するなど、詳細な検討を実施している。

6. 酸素輸送血漿増量剤としての効果

ラット脱血ショックモデルを用いて、PEG_{M2-6} (HSA-Fe4P) の生体内酸素輸送能を評価した。推定総血液量の65%をHSAで交換し、さらに30%量を脱血、等量のPEG_{M2-6} (HSA-Fe4P) 溶液を静脈内投与して、2時間後までの生存時間、呼吸循環器系パラメーター、組織酸素分圧、血液ガスパラメータを測定した²³⁾。対照はHSA投与群と洗浄赤血球 (Hb濃度 5 g/dL : Fe4Pのへ

ム鉄濃度相当量) 投与群とした。脱血終了後、平均血圧、心拍数、呼吸数、組織酸素分圧 (腎皮質及び外腹斜筋)、PaCO₂およびPvO₂が低下し、PaO₂、pH及び乳酸濃度の上昇が認められた。HSAの投与だけでは、これらの変化を改善することなく、投与終了後42分以内に5例全例が死亡した (Fig. 6.A)。一方、洗浄赤血球を投与すると、全ての数値がほぼ脱血前値にまで回復し、5例全例が投与終了120分後まで生存した。PEG_{M2-6} (HSA-Fe4P) の投与では、投与終了後に平均血圧、心拍数、呼吸数、外腹斜筋酸素分圧、PaO₂、PaCO₂、PvO₂および乳酸濃度が脱血前値まで回復した (Fig. 6.B-D)。投与終了後120分までに5例全例が生存し、酸素輸送能を有する血漿増量剤としての効果が実証された。

7. まとめ

合成ヘム蛋白質HSA-FeXPの分子表面をPEG鎖 (分子量 : 2 kDa または5 kDa) で修飾すると、in vitro, in vivoにおける酸素輸送能が改善される。PEG修飾は酸素結合速度を低下させるが、不可逆酸化を抑止するため、酸素錯体の安定度を増大させる。5 kDa PEGによる修飾では、溶液粘度、COPが上昇するものの、2 kDa PEGの場合、これらの値に大きな変化は見られない。FeXPの血中滞留時間は、PEG鎖の結合様式に大きく依存した。特にPEG_{MY} (HSA-FeXP) の半減期はPEG_{SY} (HSA-FeXP) に比べると6-8倍に延長された。また、脱血ショックモデルを用いた蘇生試験から、PEG_{MY} (HSA-FeXP) 溶液が酸素輸送血漿増量剤として有用な製剤となり得ることが示された。

我々はごく最近、PEG_{MY} (HSA-FeXP) 溶液をガラス板に滴下し、水を蒸発させると、赤色透明薄膜が得られることを見出した。この薄膜は窒素雰囲気下でFe (II) 5配位高スピン錯体 (デオキシ体) を形成し、空气中へ出すと酸素を可逆的に吸脱

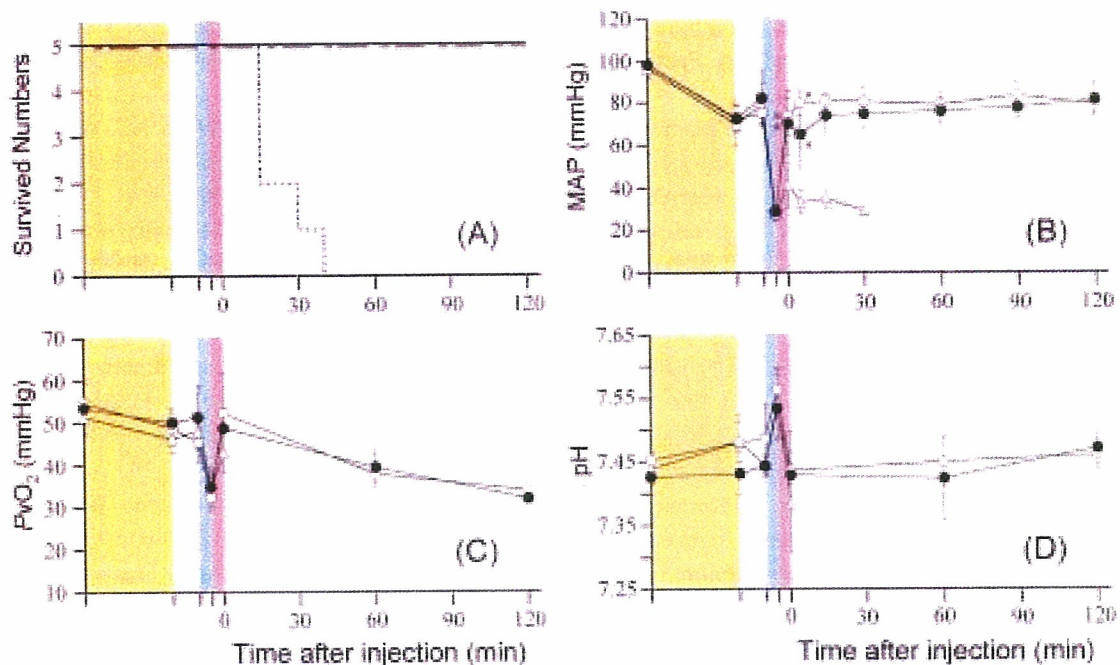


Fig. 6. Effect of PEG_{M26}(HSA-Fe4P) solution in anesthetized rats subjected to hemodilution and hemorrhage; (A) the changes of their survived numbers, (B) MAP, (C) PvO₂, and (D) pH. In (A), solid line; PEG_{M26}(HSA-Fe4P) group, broken and dotted line; RBC group, and dotted line; HSA group. In (B), (C), (D), each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 rats [●; PEG_{M26}(HSA-Fe4P) group, ○; RBC group, and △; HSA group]. The yellow, blue, and pink areas indicate the periods of 65% hemodilution, 30% bleeding, and sample infusion, respectively. * $p < 0.05$ versus HSA group (Tukey-Kramer test).

着した。再び水に溶解しスペクトル測定を行うと、薄膜にする前と同じように酸素結合が繰り返し観測された。PEG修飾HSA-FeXPはフィルムとして保存・携帯のできる人工酸素運搬体となる。

尚、本稿で紹介しきれなかった内容の詳細については、参考文献に詳しいのでそちらを参照頂ければ幸いである。

謝 辞

本研究は、ニプロ(株)および厚生省科学研究費補助金(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)の支援により行われた。記して謝意を表する。

参考文献

1. (a) Harris JM, Ed. (1992) Poly (ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum Press, New York; (b) Veronese FM, Harris JM. Introduction and overview of peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:453–456; (c) Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv Rev* 2002;54:459–476.
2. Veronese FM. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* 2001;22:405–417.
3. Nucci ML, Shorr R, Abuchowski A. The therapeutic value

of poly (ethylene glycol) modified proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 1991;6:133–151.

4. Kawahara NY, Ohno H. Induced thermostability of poly (ethylene oxide)-modified hemoglobin in glycols. *Bioconjugate Chem* 1997;8:643–648.
5. Yabuki A, Yamaji K, Ohki H, Iwashita Y. Characterization of a pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate as a physiologic oxygen carrier. *Transfusion* 1990;30:516–520.
6. Talarico TL, Guise KJ, Stacey CJ. Chemical characterization of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate. *Biochim Biophys Acta* 2000;1476:53–65.
7. Vandegriff KM, Malavalli A, Wooldbridge J, Lohman J, Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509–516.
8. Manjula BM, Tsai A, Upadhy R, Perumalsamy K, Smith PK, Malavalli A, Vandegriff K, Winslow RM, Intaglietta M, Prabhakaran M, Friedman JM, Acharya AS. Site-specific PEGylation of hemoglobin at Cys-93 (β): correlation between the colligative properties of the PEGylated protein and the length of the conjugated PEG chain. *Bioconjugate Chem* 2003;14:464–472.

9. Peters T. (1996) All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press, San Diego.
10. (a) Komatsu T, Hamamatsu K, Wu J, Tsuchida E. Physicochemical properties and O₂-coordination structure of human serum albumin incorporating tetrakis-(o-pivalamido) phenylporphyrinatoiron (II) derivatives. *Bioconjugate Chem* 1999;10:82–86; (b) Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Hamamatsu K, Wu J. Human serum albumin incorporating tetrakis (o-pivalamido) phenylporphyrinatoiron (II) derivative as a totally synthetic O₂-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* 1999;10:797–802; (c) Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Kinetics of CO and O₂ binding to human serum albumin-heme hybrid. *Bioconjugate Chem* 2000;11:772–776; (d) Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Effect of heme structure on O₂-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: Intramolecular histidine coordination provides a stable O₂-adduct complex. *Bioconjugate Chem* 2002;13:397–402; (e) Nakagawa A, Komatsu T, Iizuka M, Tsuchida E. Human serum albumin hybrid incorporating tailed porphyrinatoiron (II) in α , α , α , β -conformer as an O₂ binding site. *Bioconjugate Chem* 2006;17:146–151.
11. (a) Komatsu T, Huang Y, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein "albumin-heme" into an acute anemia rat model after seventy-percent hemodilution. *J Biomed Mater Res* 2004;71A:644–651; (b) Huang Y, Komatsu T, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Exchange transfusion with entirely synthetic red-cell substitute albumin-heme into rats: physiological responses and blood biochemical tests. *J Biomed Mater Res* 2004;71A:63–69.
12. Adams PA, Berman MC. Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric hemin *Biochem J* 1980;191:95–102.
13. Russo SM, Pepe JA, Donohue S, Cable EE, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Tissue distribution of zinc-mesoporphyrin in rats: relationship to inhibition of heme oxygenase. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 1995;272:766–774.
14. Huang Y, Komatsu T, Wang R-M, Nakagawa A, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)-conjugated human serum albumin including iron porphyrins: surface modification improves the O₂-transporting ability, *Bioconjugate Chem* 2006;17:393–398.
15. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971;31:87–96.
16. Pedersen AO, Jacobsen J. Reactivity of the thiol group in human and bovine albumin at pH 3-9, as measured by exchange with 2,2'-dithiodipyridine. *Eur J Biochem* 1980;106:291–295.
17. Vandegriff KD, McCarthy M, Rohlf S, Winslow RM. Colloid osmotic properties of modified hemoglobins: chemically cross-linked versus polyethylene glycol surface-conjugated. *Biophys J* 1997;69:23–30.
18. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M. Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skinfold model. *Am J Physiol* 1998;275:H2170–80.
19. Tsuchida E, Komatsu T, Kumamoto S, Ando K, Nishide H. Synthesis and O₂-Binding properties of tetraphenylporphyrinatoiron (II) derivatives bearing a proximal imidazole covalently bound at the β -pyrrolic position. *J Chem Soc Perkin Trans2* 1995;1995:747–753.
20. Komatsu T, Ohmichi N, Nakagawa A, Zunszain PA, Curry S, Tsuchida E. O₂ and CO binding properties of artificial hemoproteins formed by complexing iron protoporphyrin IX with human serum albumin mutants. *J Am Chem Soc* 2005;127:15933–15942.
21. Sugawara Y, Shikama K. Autoxidation of native oxymyoglobin. *Eur J Biochem* 1980;110:241–246.
22. Tsuchida E, Komatsu T, Hamamatsu K, Matsukawa Y, Tajima A, Yoshizu A, Izumi Y, Kobayashi K. Exchange transfusion of albumin-heme as an artificial O₂-infusion into anesthetized rats: physiological responses, O₂-delivery and reduction of the oxidized heme sites by red blood cells. *Bioconjugate Chem* 2000;11:46–50.
23. Huang Y, Komatsu T, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. PEGylated albumin-heme as an oxygen-carrying plasma expander: exchange transfusion into acute anemia rat model. *Biomaterials* 2006;27:4477–4483.

ヘモグロビン小胞体 (HbV)-リコンビナントアルブミン分散溶液による 40% 交換輸血：ラット脾臓内 HbV 代謝と造血に関する 2 週間の観察[†]

酒井 宏水¹⁾ 堀之内宏久²⁾ 山本 学²⁾ 池田 栄二³⁾ 武岡 真司⁴⁾
高折 益彦⁵⁾ 土田 英俊¹⁾ 小林 紘一²⁾

(背景) 輸血代替として開発されたヘモグロビン小胞体 (HbV, 粒径 $251 \pm 81 \text{ nm}$) について, 動物投与試験によりその酸素運搬機能が明らかにされてきた. しかし投与後の中長期的な回復過程, 特に細網内皮系における HbV の分解と造血については十分な検討が為されていなかった. (方法) Wistar 系ラット (♂, 60 匹) を用い, HbV を 5 g/dL 濃度のリコンビナントアルブミン溶液 (rHSA) に分散させた溶液 (HbV/rHSA), ラット保存赤血球を rHSA に分散させた溶液 (sRBC/rHSA), 或は rHSA 溶液単独で, 循環血液量の 40% を急速交換した. その後最長 14 日間の血液学的, 血液生化学的解析, および組織病理学的検討を実施した. (結果) HbV/rHSA 群と rHSA 群では, 血液交換後に低下したヘマトクリット値 (Hct, 約 26%) が, 7 日後には交換前の値 (43%) にまで回復した. 血中エリスロポエチン濃度は, 全群で上昇した. 特に rHSA 群で 1 日後に最も高い値を示し ($321 \pm 123 \text{ IU/L}$), 貧血状態を反映したと考えられた (HbV/rHSA, 153 ± 22 ; sRBC/rHSA, 63 ± 7 ; baseline, 21 ± 3). また, 同時に全群で脾臓肥大を認めた (HbV/rHSA > rHSA > sRBC/rHSA). 組織病理学的観察から, 脾臓に捕捉された HbV は 14 日以内に完全に消失した. しかし, ヘモジデリン沈着が HbV/rHSA 群および sRBC/rHSA 群に認められた. また, rHSA 群と HbV/rHSA 群の赤脾髄に多量の赤芽球が存在した. (結論) 40% 交換輸血において, 脆弱な赤血球が細網内皮系で捕捉分解される生理的機序と同様の経路を経て, HbV が捕捉代謝される過程が予想された. また, 造血機能の亢進により Hct が 7 日以内に完全に支障無く回復することを確認した.

キーワード：人工血液, 人工酸素運搬体, 人工赤血球, リボソーム, 代用血漿剤

[†]本論文内容は, Transfusion 誌編集長および Blackwell Publishing 社の許可のもと, Transfusion 第 46 巻 第 3 号 339 頁–347 頁, 2006 年に最初に掲載された論文に基づき作製したものである (This article is based on a study first reported in the paper : Sakai H, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Takaori M, Tsuchida E, Kobayashi K : Acute 40 percent exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles (HbV) suspended in recombinant human serum albumin solution : degradation of HbV and erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks. Transfusion. 46 (3) : 339–347, 2006)

第 53 回日本輸血学会総会推薦論文

1. 緒 言

ヘモグロビン (Hb) を利用した人工酸素運搬体 (Hb-based O_2 carriers, HBOCs) の研究が世界的規模で進展し, 臨床試験の段階にある製剤も幾つか知られている¹⁾²⁾. HBOC の利点は, 血液型が無いこと, 病原体を完全に排除できること, また, 赤血球に比較して長期間の保存が可能なことである³⁾. 血中滞留時間が赤血球に比較して 2–3 日と短いものの⁴⁾, 様々な短時間の用途が期

待されている. 例えば, 1) 緊急時の出血性ショックの蘇生液として, 輸血までの繋ぎとしての投与⁵⁾, 2) 術前の血液希釈, 術中の出血に対する投与により, 輸血の回避, 或は輸血を遅らせる手段⁶⁾, 3) 心臓手術の際に使用する体外循環回路の補充液としての利用, 4) 酸素治療剤として, 虚血性疾患など局所的低酸素状態の改善薬としての利用, などがある⁸⁾⁹⁾.

筆者らが開発したヘモグロビン小胞体 (HbV) は,

1) 早稲田大学理工学研究所

2) 慶應義塾大学医学部外科

3) 慶應義塾大学医学部病理学科

4) 早稲田大学理工学術院

5) 東宝塚さとう病院

〔受付日：2006 年 10 月 5 日, 受理日：2006 年 12 月 12 日〕

期限切れ赤血球から精製した高純度高濃度ヒト Hb 溶液を脂質膜で被覆した微粒子構造をしている¹⁰⁾¹¹⁾。赤血球と類似の細胞構造により、本来毒性を有する分子状 Hb と血管内皮細胞との直接的接触の回避が可能となる¹²⁾¹³⁾。血中に投与された HbV は、酸素運搬機能を終えた後、最終的に細網内皮系 (RES, Reticuloendothelial system) マクロファージに捕捉、分解されることが負荷投与試験から明らかになっている^{14)~17)}。これまでに、HbV をヒト血漿由来のアルブミン或はリコンビナントアルブミン溶液 (rHSA) に分散させ、循環血液量の 80~90% を交換する極度の血液希釈試験、50% 脱血による出血性ショックモデルに対する蘇生試験等で、急性期において赤血球と同等の酸素運搬機能が実証されてきた^{18)~21)}。しかし、投与後数時間の観察に留まっており、中長期的な観察は充分になされていなかった。

そこで本研究では、HbV を rHSA 溶液に分散させた溶液を用い、臨床的に想定される 40% の血液交換をラットモデルを用いて行い、その後 2 週間に亘る観察を行った。血液生化学検査、血液学的検査、組織病理学的検査を行い、特に RES における HbV の代謝と Hct の回復過程について注目した。単回負荷投与、或は反復負荷投与の際には、肝臓よりも脾臓の肥大が顕著であり¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾、更に、老化赤血球は脾臓にて捕捉代謝されることが知られているので²²⁾、本研究では、輸血モデルとして保存赤血球を投与した場合も実施し、脾臓への影響を比較検討した。

2. 材料・方法

2-1. rHSA に分散させた HbV の調製

HbV は無菌的条件下にて、既報に従って調製した²³⁾²⁴⁾。精製ヒト Hb 溶液は、日本赤十字社から提供を受けた期限切れヒト赤血球より調製した。HbV は 38g/dL の Hb 溶液を内包している。アロステリック因子として pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を含有する (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, PLP : Hb = 2.5 : 1 by mol)。HbV の脂質膜には、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine, cholesterol, 1,5-O-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate (日本精化、大阪)、および 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-PEG₅₀₀₀ (日本油脂、東京) が、5/5/1/0.033 の割合で存在している。エンドトキシン含量は、リムルス法の変法により 0.1EU/mL 以下であることを確認した²⁵⁾。物理化学的パラメータとして、酸素親和度 (P_{50}) が 27Torr、粒径 251 ± 81 nm、metHb 含量は 3% 以下であった。HbV 分散液 ($[Hb] = 10\text{g/dL}$) 8.6mL を rHSA 溶液 (25g/dL) 1.4 mL と混合し、HbV が分散している外液の rHSA 濃度を 5g/dL に調節した。従って、得られた HbV/rHSA の Hb 濃度は $8.6\text{g/dL} \{= 10\text{g/dL} \times 8.6 / (8.6 + 1.4)\}$ にな

る。このとき膠質浸透圧は 20Torr、粘度 2.9cP になる。

2-2. rHSA に分散させたラット保存血の調製

エーテル麻酔下、Wistar 系ラットの下大静脈から急速脱血した。ラット血液 10mL に対し、血液保存液 (CPDA-1, 川澄化学社製) を 1mL 加え、密封して 4℃ にて 1 週間冷蔵保存した。報告によれば、1 週間保存したラット赤血球の脆弱性は、ヒト赤血球を同条件で 4 週間保存したものと同等になる²⁶⁾。保存後、遠心分離 (4,000 g, 10min) して血清と白血球を除去し、再度生理食塩水を等量加えて遠心分離する操作を二回繰り返した。次いで 5g/dL の rHSA を添加して再分散させ、再度遠心分離して上澄みを除去し、rHSA を添加して Hb 濃度を 8.6g/dL に調節した (sRBC/rHSA)。

2-3. 血液交換試験と 2 週間の観察

Wistar 系ラット 65 匹を用いた (♂, $223 \pm 20\text{g}$)。ネンブータル (Abbot Laboratories, North Chicago, IL) を腹腔内投与し (1mL/kg) 麻酔状態とし、頸動脈にポリエチレン製カテーテル (SP31) を挿入した。1mL/30 sec の脱血と同量の試料溶液投与を繰り返して 40% の血液を交換した。試料溶液は、HbV/rHSA (HbV 群, $n=20$)、sRBC/rHSA (sRBC 群, $n=20$)、および rHSA 単独の投与 ($n=20$) である。ベースラインの値を知るため、5 匹のラットを使用した。

循環血液量は 56mL/kg 体重と推定し²⁷⁾、これを維持しながら血液を交換すると仮定し、実験に必要な HbV 分散液の量を計算した。1.0mL の脱血と試料等投与を繰り返したと仮定すると、40% の血液交換は次式で示される。

$$40\% = 100 \times \{1 - [(0.056 \times \text{体重} - 1.0) / (0.056 \times \text{体重})]\}^n \quad (1)$$

総投与量は、 $n \times 1.0$ (mL) と計算できる²⁸⁾。体重 220 g のラットの場合、必要量は 6.0mL になる。

血液交換終了後、カテーテルを外し、右頸動脈を結紮、切開部を縫合した。ラットはその後、ケージに入れ最長 14 日間生存させた。投与後 1, 3, 7, 14 日目に各群から 5 匹を選択し、1.5% セボフルレン吸入麻酔下、尾静脈より 24G-留置針 (ニプロ社製) を使用して採血 (150μL) し、ヘマトクリットと血球数測定を行った (Model KX-21, シスメックス、神戸)。開腹して下大静脈から採血し、血液生化学検査の検体とした。その後直ちに臓器を摘出し、10% ホルマリン中性リン酸溶液に浸漬固定し、パラフィン包埋した。4μm 厚の切片について、ヘマトキシリン-エオジン (H/E) 染色、ベルリンブルー染色、および、ギムザ染色を実施した。

脱血液 (約 6mL) を遠心分離 (5,000g, 10 分) し、血漿を得た。HbV が血漿中に残存している場合 (1, 3 日後) には、更に超遠心分離 (50,000g, 20 分) によりこれを沈降分離し、透明な血漿層を測定検体とし、血

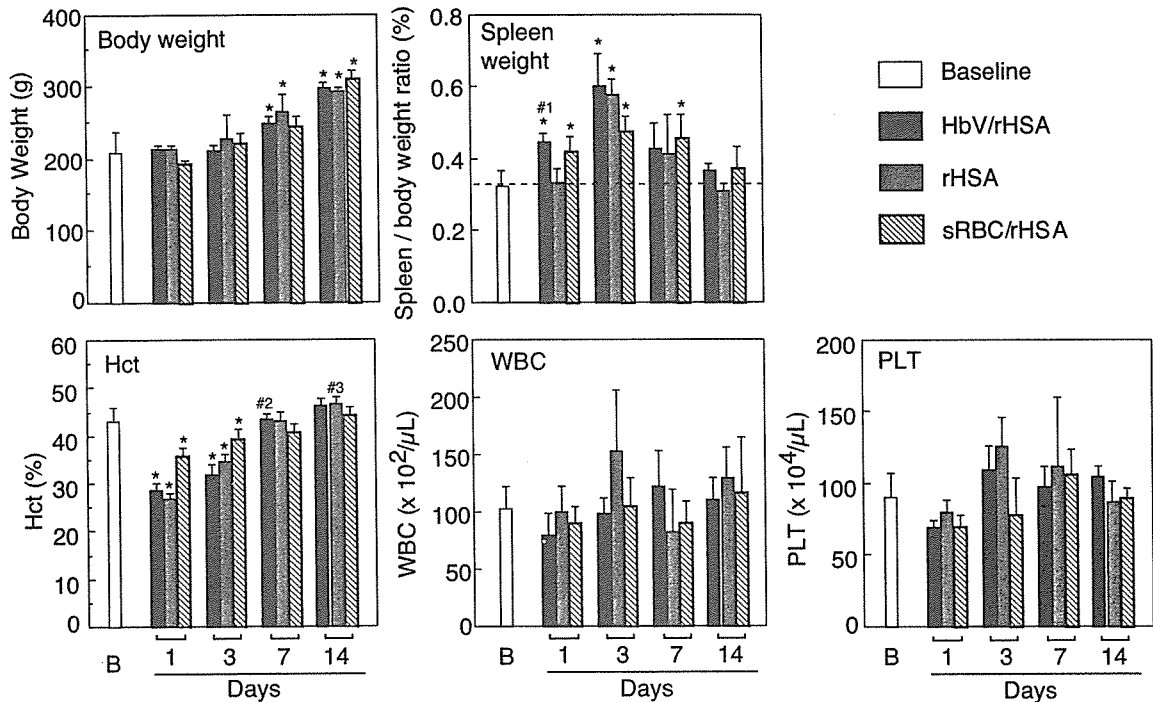


図1 40%血液交換後の体重、脾臓重量比、および血球数の変化。* $p < 0.01$ vs baseline; #1 $p < 0.01$ vs. rHSA 群; #2 $p = 0.0288$ vs. sRBC/rHSA; #3 $p = 0.0353$ vs. sRBC/rHSA. B: baseline. (From: Sakai et al., Transfusion 2006; 46: 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

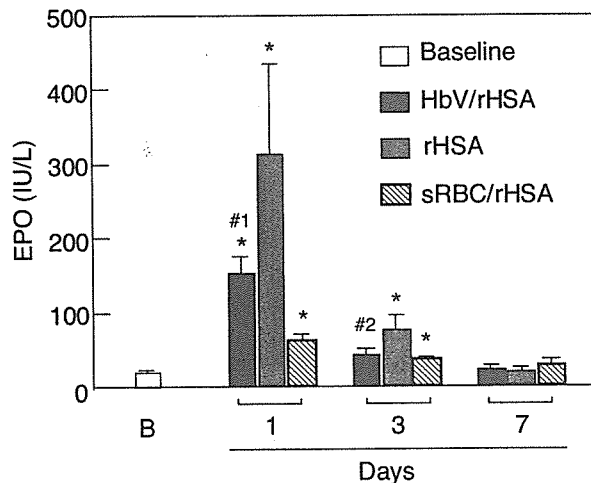


図2 40%血液交換後の血中エリスロポエチンの濃度変化。* $p < 0.01$ vs baseline; #1 $p = 0.0222$ vs. rHSA; #2 $p = 0.0195$ vs. rHSA. B: baseline. (From: Sakai et al., Transfusion 2006; 46: 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

液生化学検査における HbV の干渉作用を排除した²⁹⁾。得られた透明な血漿には Hb が含まれず、HbV の溶血が無いことを示した。血漿検体は検査まで -80°C にて凍結保存した。測定項目は、肝臓、腎臓機能等を反映する通常の検査項目のほか、エリスロポエチン (EPO)、および HbV の分解排泄を反映すると考えられる脂質成分と、ビリルビン、遊離鉄等とした (BML 社)。ラッ

トの EPO は、ヒトの EPO との相溶性が高いので、抗ヒト EPO 抗体での検出が可能であった³⁰⁾。

動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験委員会の承認を得て実施した。また、Guide for the Care and Use of Laboratory Animal の指針に従った³¹⁾。

2-4. 統計処理

結果は全て平均 $\pm$ 標準偏差 (SD) として記した。コントロール群と処置群の間の有意差検定には、Fisher's protected least significance difference test および one way ANOVA 法を用いた。p 値が 0.01 以下のときに有意な差と判定した。

3. 結 果

3-1. 体重、脾臓重量、血液学的検査の結果

全群が 40% 交換輸血に耐え、犠牲死させるまで生存した。これは、5g/dL の rHSA 溶液の使用により、膠質浸透圧と循環血液量を一定に保ち乍ら血液希釈を行ったことが理由として先ず考えられる。体重 (約 223g) は 14 日後には 300g 程度にまで成長した (図 1)。立毛などの異常な症状は認められなかった。

体重に対する脾臓重量の変化では、HbV/rHSA 群で特に、1, 3 日後に有意に増大していたが、14 日後には正常値に復した。rHSA 群では 1 日後には変化は無いが、3 日後に急激に増大し、その後低下して 14 日後には正常値に復した。sRBC 群は HbV 群よりは程度は低いものの 1 日後から 7 日後まで脾臓肥大が見られた。

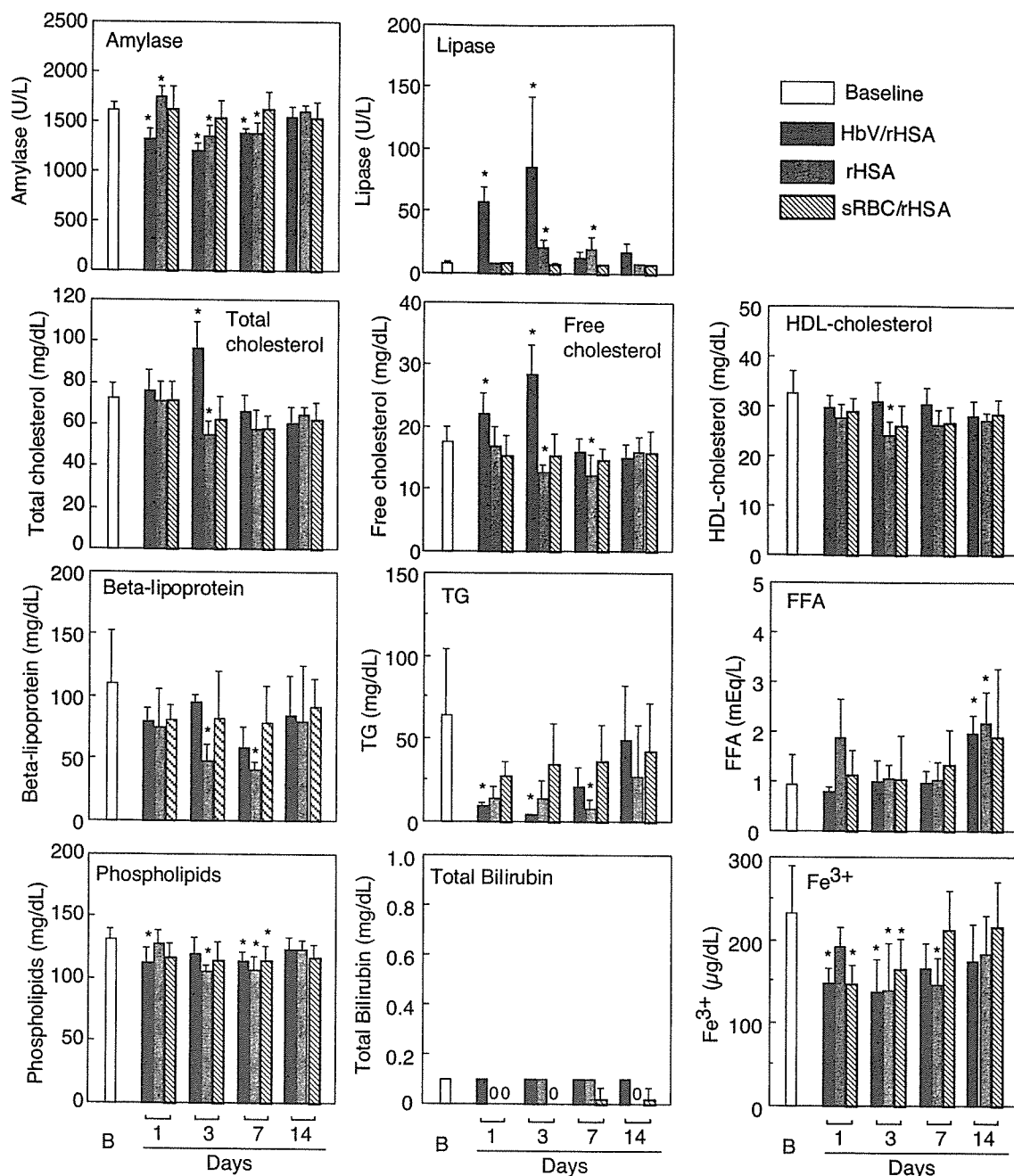


図3 40% 血液交換後の血液生化学検査の結果。* $p < 0.01$ vs. baseline. Triglyceride, TG : free fatty acid, FFA : baseline, B. (From : Sakai et al., Transfusion 2006 ; 46 : 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

Hct 値は、血液交換前は 43% であったが、HbV/rHSA 群および rHSA 群は、血液交換後 Hct 値が 26% に低下した。7 日後には交換前の値 (43%) に復し、更に 14 日後には 46% になり、交換前の値を超えた。sRBC/rHSA 群では、投与後の値は高いが、7、14 日後では他の二群に比較して低めの値を示した。平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) に異常を認めなかった。但し、HbV/rHSA 群では、1、3 日後に血液中に HbV が残存しているため、測定不能であった。sRBC/rHSA 群では、1 日後の MCH および MCHC で低下傾向がみ

られた。Hct 値とは対照的に、血小板数および白血球数は、安定した値を推移した。HbV 由来の血漿中 Hb 濃度は、血液交換直後は 4.4g/dL と想定され、その後、1、3、7 日後に 1.8 ± 0.1 、 1.1 ± 0.1 、 0 g/dL に低下した。

3-2. 血液生化学検査

血中 EPO 値は、貧血、低酸素状態、ストレス等を反映する項目であり、血液交換前の $21 \pm 3 \text{ IU/L}$ が、1 日後に rHSA 群が $321 \pm 123 \text{ IU/L}$ を示し、これは HbV/rHSA 群 (153 ± 22)、sRBC/rHSA 群 (63 ± 7) よりも高値であった (図 2)。しかし 3 日目には低下傾向にあり、7 日後には処置前の値に復した。

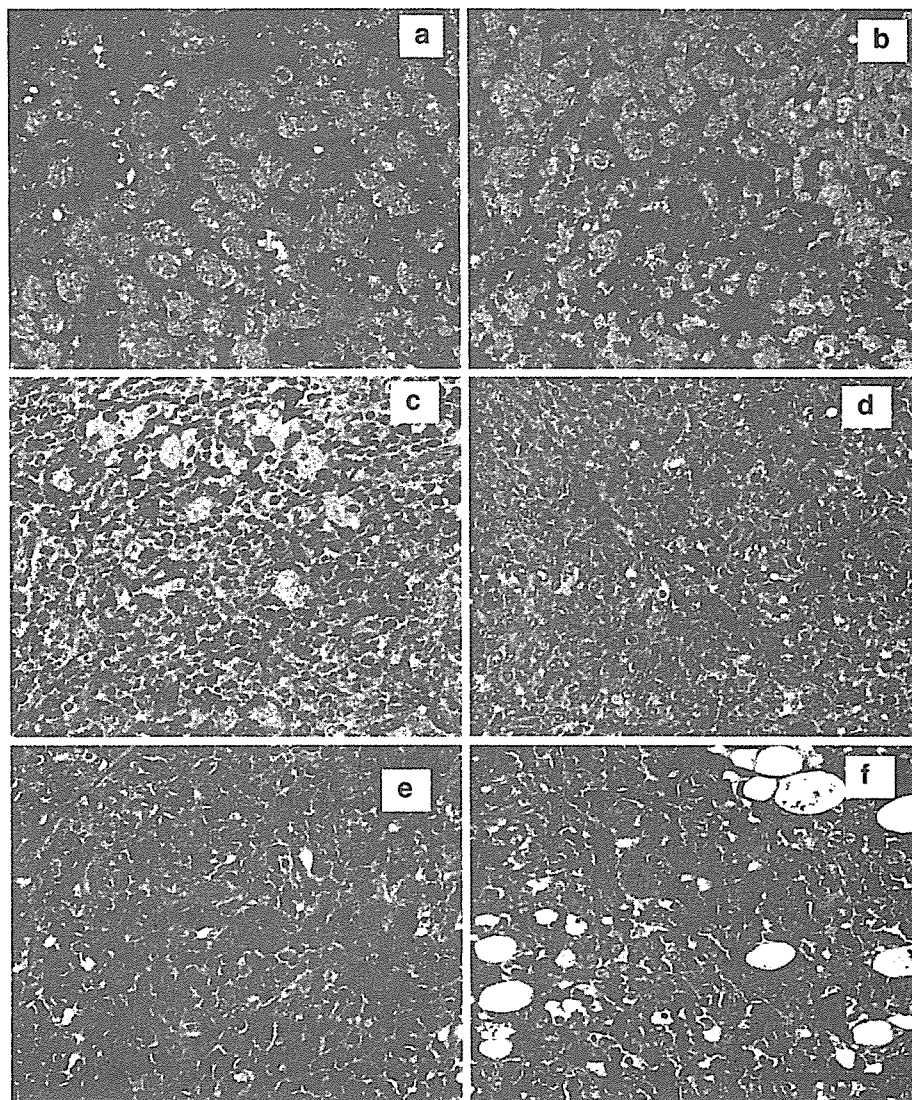


図4 HbV/rHSA 群および rHSA 群の組織切片のギムザ染色像。(a),(b),(c)は、HbV/rHSA 群の1, 3, 7日後の脾臓。捕捉されたHbVは薄青色の領域(黒矢印)。赤芽球系は濃青色の細胞として確認される(赤矢印)。HbVは7日後には可成り減少する。(d) HbV/rHSA 群の14日後の脾臓。HbVは完全に消失した。(e) rHSA 群の3日目の脾臓。赤芽球系が多く認められる。(f) HbV/rHSA 群の3日目の骨髄にも濃青色の赤芽球が存在する。紫のスポットが点在する細胞は好塩基球と考えられる。スケールバーは50 μ m。(From: Sakai et al., Transfusion 2006; 46: 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

その他、AST 値が1日目に若干の上昇傾向を示したが(HbV/rHSA, 70 ± 5 U/L; rHSA, 69 ± 12 ; sRBC/rHSA, 72 ± 9 ; 正常値, 60 ± 7)、3日後には正常値に復した。ALT 値は特に変化はなかった。ALP および γ -GTP には多少の変動があった。CPK は安定していた。全群について、クレアチニン、尿酸は低値傾向を示した。アミラーゼに低下傾向が見られたが(図3)、HbV/rHSA 群のみ、リパーゼの上昇を認めたが、7日後には正常値に復した。脂質成分濃度については、HbV/rHSA 群で血中の総コレステロール、遊離コレステロールの亢進が3日後に見られたが、7日後には正常値に復した。 β -リポ蛋白、高密度リポ蛋白コレステロールは、血液交

換後に特に rHSA 群で低下傾向があった。トリグリセリドも全群で低下傾向にあり、特に HbV/rHSA 群で1, 3日後に顕著であった。これは、血漿を超遠心分離した際に分離されたことも一因と考えられた。リン脂質は全群で僅かに低下傾向にあった。遊離脂肪酸は14日後に増加傾向にあった。ビリルビン濃度(<0.1mg/dL)は常に低値を推移した。遊離鉄濃度は低下傾向にあったが、14日後には血液交換前の値に復した。

3-3. 組織病理学的検討

全群において肺、心臓、腎臓等に著変を認めなかった。HbV/rHSA 群では1, 3日後に肝臓のクッパー細胞、骨髄のマクロファージに捕捉されたHbVが観察された

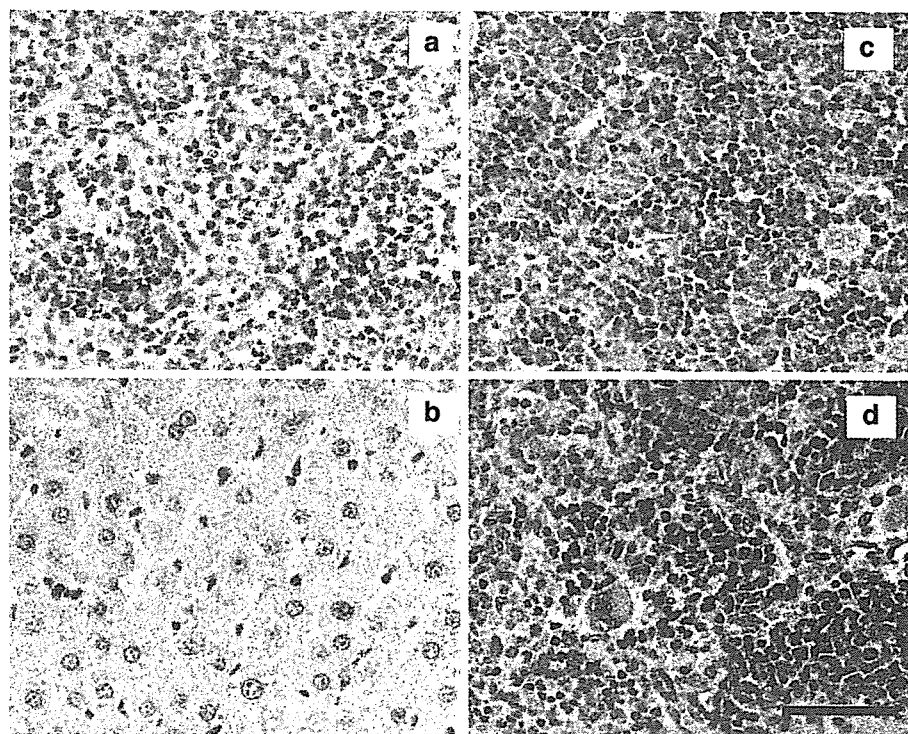


図5 HbV/rHSA 群およびsRBC/rHSA 群の14日後の組織切片のベルリンブルー染色像。HbV/rHSA 群の (a) 脾臓, (b) 肝臓, および (c) 骨髄。脾臓と肝臓にヘモジデリンが存在した。 (d) sRBC/rHSA 群の脾臓にもヘモジデリンが検出された。スケールバーは50 μ m。
(From : Sakai et al., Transfusion 2006 ; 46 : 339-347, Blackwell Publishing, Oxford, UK)

が次第に減少し、14日後には消失した。HbV/rHSA 群では3日後に血中リパーゼの上昇が認められたが、脾臓に著変は認められなかった。HbV/rHSA 群の脾臓のギムザ染色では、1, 3 日後に赤脾髄に捕捉されたHbVが多く認められた。しかし7日後には減少し、14日後には消失していた (図4)。実験期間を通して脾索に赤芽球および前赤芽球の巣 (集合) が多く存在し、特に3, 7 日後で顕著であった。巣の形成から、活発な髄外造血が伺えた。rHSA 群でも3日目に赤芽球巣を多く認めた。骨髄での造血もHbV/rHSA 群で確認された。ベルリンブルー染色により、HbV/rHSA 群で7日後に脾臓にヘモジデリンが僅かに観測され、14日後に更に顕著になった (図5)。僅かに肝臓のクッパー細胞にも認められたが、骨髄には無かった。sRBC/rHSA 群では、14日後に脾臓にヘモジデリン沈着が観測された。

4. 考 察

本研究における重要な点は、HbV/rHSA 溶液により40% 血液交換されて低下したHct 値が、7日後には完全に回復したこと、また、14日までにRESに捕捉されたHbVがほぼ消失したことである。HbV 群の脾臓肥大は、赤脾髄へのHbVの捕捉と、EPO 分泌に反応して強い造血作用により赤芽球巣が脾索に多く存在する事に起因すると考えられた。しかし脾臓重量は14日後には

完全に回復していた。

これまでの放射化ラベルしたHbVの体内動態の研究から、HbVは最終的にRESに移行することが解っている¹¹⁾¹⁶⁾。脾臓肥大の一因は、図4から解るように、HbVが赤脾髄に捕捉されることであるが、14日後には消失する。投与3日後までの血中コレステロールの緩やかな上昇、またHbVが血中では分解しない事実から、HbVがRESのマクロファージの食胞で捕捉分解されてからコレステロールが血中に遊離したものと考えられた¹⁴⁾¹⁵⁾。既報のHbV 負荷投与試験の結果では、高密度リポ蛋白コレステロール、 β リポ蛋白、リン脂質の増大が、過剰量として血中に確認された¹⁵⁾¹⁷⁾。しかし、今回の40% 交換輸血試験では、それらの上昇が見られず、むしろ低下する傾向もあった。従って大量の血液がHbV/rHSA で置換された場合には、HbVの脂質成分が体内で有効利用され、造血や成長に使用された可能性がある。

HbVが大量に投与され、その分解過程でヘム鉄やポルフィリンの分解物であるビリルビンが大量に遊離することを懸念したが、血中濃度の上昇は14日間全く見られなかった。Hbから放出されたヘムは、肝臓クッパー細胞や、脾臓マクロファージの誘導型ヘムオキシゲナーゼ-1の酵素分解を受け、ビリルビンに変化する¹⁵⁾³²⁾。今回の実験から、HbVの大量投与に際してもビリルビンは通常の経路によって分解され、胆汁となって排泄さ

れること、また胆汁管排泄機能に影響が無いことが考えられた。ペルリンブルー染色では、14日後の肝臓と脾臓にヘモジデリン沈着が認められた。通常、ヘム由来の鉄はフェリチンとして蓄えられるが³³⁾、鉄含量が多くなるとヘモジデリンになる。フェリチンもヘモジデリンも鉄イオンを遊離し、過酸化水素とのフェントン反応によりOHラジカルを産生し、これが脂質過酸化を助長する懸念がある³⁴⁾。しかし化学的には、不溶化沈着したヘモジデリンの方がフェリチンよりも不活性であるとの見方もある³⁵⁾。一般的に輸血を頻回受ける患者では、保存赤血球の血中半減期が短いRESに捕捉され、ヘモジデリンが多く認められる。本研究では、sRBC群でも緩慢ではあるが脾臓肥大とヘモジデリン沈着が認められた。保存血では老化赤血球のように赤血球の変形能力が低下し脆弱となり、血中滞留時間が短くなり脾臓で捕捉、分解されることも原因の一つと考えられる²⁶⁾。これらのことから、HbV由来のヘムの分解および鉄の貯蔵は、生理的許容範囲内であり、脆弱な保存赤血球の場合と同様の良く知られた生理的経路により行われていることが予想できた³⁶⁾。

興味深い事に、脾臓肥大はHbV/rHSA群およびsRBC/rHSA群だけでなく、rHSA群で3日目に顕著であった。文献によると、ラットは低酸素状態に曝されると、髄外造血が脾臓で顕著になる³⁷⁾³⁸⁾。我々の実験では、rHSA群で特に3日目に大量の赤芽球巢の存在を見出している。¹²⁵I-rHSAの体内動態に関する文献から³⁹⁾⁴⁰⁾、rHSAが異種蛋白質として脾臓に特異的に捕捉される可能性は低く、脾臓肥大との関係も無いと考えられる。従ってrHSA群の脾臓肥大は、EPO分泌によって髄外造血が活性化された為と考えられた。

腎臓から分泌されるEPOは、貧血の状態を強く反映する⁴¹⁾⁴²⁾。rHSA群で投与1日後に最も高いEPO値を示し、酸素運搬量の低下により貧血状態が最も強かったことが伺える。次いでHbV/rHSA群が高値を示した。これはHbVの血中半減期が短い事と、酸素運搬機能の無いmetHbの含量が増大することに起因している⁴³⁾。また、sRBC/rHSA群でも血液交換後にHctが低下しているため、EPO値の緩慢な上昇が確認された。従って、HbV/rHSA群およびsRBC/rHSA群の脾臓肥大のもう一つの要因として、造血過程における赤芽球巢の存在があり、これがHctを1週間で回復させた原動力であると考えられる。興味深い事に、rHSA群、HbV/rHSA群の14日後のHct値は46%となり、sRBC群の値(43%)を上回っていた。これはEPO分泌量がrHSA群、HbV群がsRBC群よりも高く、造血が亢進されたため overshootingしたのかもしれない。MCH、MCV、MCHCが正常であったことも、造血作用に異常が無いことを支持している。

血液生化学検査では、HbVが大量に肝臓クッパー細胞に移行するにも関わらず、特に肝機能に影響が無いことを示唆した。HbVの投与によってリパーゼの上昇が既報の負荷投与試験も含め常に認められている。これは、HbVの成分である脂質によって、リパーゼの分泌が亢進したのかもしれない¹⁵⁾¹⁷⁾⁴⁴⁾。

結論として、臨床でのHbVの使用を想定したラットへの投与試験(40%血液交換)に際し、ラットは全例が生存し、血液希釈により低下したHctは7日以内に回復した。一過性の脾臓肥大とヘモジデリン沈着が確認されたが、余剰な鉄イオンの遊離は認められなかった。HbVは脆弱な保存赤血球の場合と同様の生理的経路により、細網内皮系で捕捉代謝され、構成成分が支障無く排泄或は再利用される過程が予想された。まだ不明の点もあるが、HbVを輸血代替として使用する場合の安全性についての知見を得ることができた。

謝辞：試料調製を担当した宗慶太郎助教授、政田洋平氏(早稲田大学)、組織病理学的検討に際し染色を担当した阿部仁氏(慶應義塾大学医学部病理学教室)、また有益なご助言を頂きました末松誠教授(慶應義塾大学医学部医化学)、ならびに村田満教授(慶應義塾大学医学部臨床検査医学)に感謝申し上げます。リコンビナントアルブミンはニプロ社より提供を受けた。本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金(医薬品・臨床機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業)、日本学術振興会 科学研究費補助金(B16300162)、日本人工臓器学会 JSAO-Grantにより推進された。また、(株)オキシジェニクスの支援を受けた。記して謝意を表する。

文 献

- 1) Chang TMS: Hemoglobin based red blood cells substitutes. *Artif Organs*, 28: 789—794, 2004.
- 2) Buehler PW, Alayash AI: Toxicities of hemoglobin solutions: in search of in-vitro and in-vivo model systems. *Transfusion*, 44: 1516—1530, 2004.
- 3) Sakai H, Tomiyama K, Sou K, et al: Polyethyleneglycol-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjugate Chem*, 11: 425—432, 2000.
- 4) Lee R, Neya K, Svizzero TA, et al: Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J Appl Physiol*, 79: 236—242, 1995.
- 5) Johnson JL, Moore EE, Offner PJ, et al: Resuscitation with a blood substitute abrogates pathologic postinjury neutrophil cytotoxic function. *J Trauma*, 50: 449—456, 2001.
- 6) Standl T, Burmeister MA, Horn EP, et al: Bovine

- haemoglobin-based oxygen carrier for patients undergoing haemodilution before liver section. *Brit J Anesth*, 80: 189—194, 1998.
- 7) York GB, DiGeronimo RJ, Wilson BJ, et al: Extracorporeal membrane oxygenation in piglets using a polymerized bovine hemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC-201). *J Pediatr Surg*, 37: 1387—1392, 2002.
 - 8) Contaldo C, Plock J, Sakai H, et al: Hemodilution with polymerized and encapsulated hemoglobins improves oxidative energy metabolism in collateralized hamster flap tissue. *Crit Care Med*, 33: 806—812, 2005.
 - 9) Nozue M, Lee I, Manning JM, et al: Oxygenation in tumors by modified hemoglobins. *J Surg Oncol*, 62: 109—114, 1996.
 - 10) Djordjevich L, Mayoral J, Miller IF, et al: Cardiorespiratory effects of exchanging transfusions with synthetic erythrocytes in rats. *Crit Care Med*, 15: 318—323, 1987.
 - 11) Awasthi VD, Garcia D, Klipper R, et al: Neutral and anionic liposome-encapsulated hemoglobin: effect of postinserted poly (ethylene glycol)-distearoyl-phosphatidylethanolamine on distribution and circulation kinetics. *J Pharmacol Exp Ther*, 309: 241—248, 2004.
 - 12) D'Agnillo F, Alayash AI: Redox cycling of diaspirin cross-linked hemoglobin induces G2/M arrest and apoptosis in cultured endothelial cells. *Blood*, 98: 3315—3323, 2001.
 - 13) Sakai H, Hara H, Yuasa M, et al: Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension in conscious hamster model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: H908—H915, 2000.
 - 14) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, et al: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in metabolism. *Am J Pathol*, 159: 1079—1088, 2001.
 - 15) Sakai H, Masada Y, Horinouchi 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.
 - 16) Sou K, Klipper R, Goins B, et al: WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther*, 312: 702—709, 2005.
 - 17) Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, et al: Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials*, 25: 4317—4325, 2004.
 - 18) Cabrales P, Sakai H, Tsai AG, et al: Oxygen transport by low and normal oxygen affinity hemoglobin vesicles in extreme hemodilution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H1885—H1892, 2005.
 - 19) Yoshizu A, Izumi Y, Park S, et al: Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicle, maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor- α . *ASAIO J*, 50: 458—463, 2004.
 - 20) Sakai H, Takeoka S, Park SI, et al: Surface-modification of hemoglobin vesicles with polyethyleneglycol and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90%-exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem*, 8: 15—22, 1997.
 - 21) Sakai H, Masada Y, Horinouchi 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.
 - 22) Landaw SA: Factors that accelerate or retard red blood cell senescence. *Blood Cells*, 14: 47—59, 1988.
 - 23) Sou K, Endo T, Naito Y, et al: Efficient up-scale production of hemoglobin-vesicles (HbV) using the freeze-thawing and rapid extrusion. *Biotechnol Progr*, 19: 1547—1552, 2003.
 - 24) Sakai H, Yuasa M, Onuma H, et al: Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem*, 11: 56—64, 2000.
 - 25) Sakai H, Hisamoto S, Fukutomi I, et al: Detection of Lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by *Limulus* amoebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment with a surfactant. *J Pharm Sci*, 93: 310—321, 2004.
 - 26) d'Almeida MS, Jagger J, Duggan M, et al: A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion. *Transfus Med*, 10: 291—303, 2000.
 - 27) Izumi Y, Sakai H, Hamada K, et al: 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: 1869—1873, 1996.
 - 28) Sakai H, Tsai AG, Kerger H, et al: Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res*