

多波長パルス分光法を用いた Hb小胞体用パルスオキシメータに関する研究

Study on Multiwavelength Pulse Spectrophotometry Applicable for Hemoglobin-vesicles

須崎 裕典^(1,2), 酒井 宏水⁽¹⁾, 小林 直樹⁽²⁾, 池田 達彦⁽³⁾, 堀之内 宏久⁽³⁾,

小林 紘一⁽³⁾, 武田 朴^(1,2), 戸川 達男⁽¹⁾, 土田 英俊⁽¹⁾

Hironori Suzuki^(1,2), Hiromi Sakai⁽¹⁾, Naoki Kobayashi⁽²⁾, Tatsuhiko Ikeda⁽³⁾, Hirohisa Horinouchi⁽³⁾,

Koichi Kobayashi⁽³⁾, Shinji Takeda^(1,2), Tatsuo Togawa⁽¹⁾, Eishun Tsuchida⁽¹⁾

和文抄録

ヘモグロビン小胞体 (HbV) は、高純度高濃度ヘモグロビン溶液をリン脂質二分子膜で被覆した形状の人工酸素運搬体である。これまでに輸血代替としての酸素運搬機能と安全性が明らかにされてきた。今後の課題の一つとして、臨床現場で緊急投与を想定した場合に、患者の呼吸管理、各種検査、HbVの機能変化の観察が継続して支障なくできることが挙げられる。パルスオキシメータ (POM) は、経皮的・非侵襲的に動脈血の酸素飽和度と心拍数を計測でき、救急医療、集中医療の現場で日常的に利用され、その有用性も十分に認知されているので、HbVを投与した場合も、支障なく使用できることが望まれる。しかし、HbVは赤血球と同じ色素Hbを有しているものの粒子径が小さく光学的特性が異なること、また、HbVは次第にHbが酸化シメトヘモグロビン (MetHb) が増大するが、POMはdeoxyHbとO₂Hbの二成分系の測定を前提としているので、正確な測定が出来ない可能性がある。そこで本研究では、現行のPOMを使用した場合のHbVの干渉作用の程度を確認するとともに、HbVを投与した後も酸素飽和度およびMetHb含量を正確に測定できる新しいPOMの開発を試みた。In vitro試験として血液循環シミュレータを構築しブタ血液を循環させ、HbVで段階的に置換したところ、現行のPOM (DDG-3300, 日本光電) が表示する酸素飽和度 (SpO₂) は低下する傾向にあり、血液置換60%のとき、SpO₂は約70%にまで低下し、HbVの干渉作用の存在が明らかになった。現行POMシステムの測定波長 (660, 940 nm) に対し、更に2波長 (620, 730 nm) を加え、計4波長の発光ダイオードを測定プローブ (TL-301P) に組み込んだ。ビーグル犬7匹を用いたHbVの投与試験 (循環血液量の40%置換) に際し、FiO₂を1.0, 0.2, 0.15 に設定して酸素飽和度を変化させ、採血液の酸素飽和度とMetHb含量の変化を4時間実測するとともに、測定プローブを舌に装着し減光度を計測した。各波長の減光度比から、酸素飽和度 (SpO₂)、およびMetHb濃度を求める計算式を重回帰分析により構築し、DDG-3300の内部ソフトウェアに導入し改良型を試作した。現行型と改良型POMを比較検討したところ、HbVの投与により、現行POMのSpO₂計測精度は7.2±3.3%であったが、改良型POMのSpO₂計測精度は1.1±1.9%に改善され、また、MetHb計測精度は0.7±1.3%であった。今後更に最適波長の検討と投与実験を重ねることにより、精度の向上が期待できる。

Abstract

A pulse oximeter (POM) is indispensable in a clinical setting to monitor arterial blood O₂-saturation (SpO₂) of a patient non-invasively. POM is designed to analyze spectrum of Hb on the arterial pulse with two wavelengths under the assumption that there are only two components of Hb, namely, deoxy- and oxy-Hb. Hb-vesicles (HbV, 250 nm) are artificial O₂ carriers, and the safety and efficacy as a transfusion alternative have been clarified. HbV encapsulates human Hb, however, the particle dispersion induces a strong light scattering in comparison with RBC, and gradual MetHb formation is inevitable because of the

(1) 早稲田大学理工学術院 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Research Institute for Science and Engineering, Waseda University 3-4-1 Okubo Shinjuku-ku Tokyo 169-8555

(2) 日本光電工業(株) 荻野記念研究所 Ogino Memorial Laboratory, Nihon Kohden Co.

(3) 慶應義塾大学 医学部呼吸器外科 Department of General Thoracic Surgery, School of Medicine, Keio University

論文受付 2008年10月7日 論文受理 2008年10月20日

lack of the MetHb-reducing system in HbV. It is speculated that such peculiar characteristics of HbV would interfere with SpO₂-monitoring. Under such background, we aimed to clarify the interference effect of HbV on the commercially available POM, and to establish a method to avoid such effect using a multiwavelength system. Using the *in vitro* blood circulation system comprised of a pulsatory pump, an artificial lung, and the POM (Nihon Kodan, DDG-3300; detection wavelengths: 660, 940 nm), we clarified that the stepwise addition of 60 vol% HbV to a pig blood tended to decrease the SpO₂ to 70%, and interference effect of HbV was evident. We introduced two detection wavelengths (620, 730 nm) in addition to 660 and 940 nm to a probe (TL-301), and tested its effectiveness in the 40%-blood exchange experiments using 7 beagles. FiO₂ was set 1.0, 0.2, and 0.15, and the accurate SaO₂ and MetHb content were monitored for 4 hrs. Equations to calculate SpO₂ and MetHb content was established by a multiple regression analysis. Using the modified POM with 4 wavelengths, the deviation of SpO₂ is minimized from -7.2±3.3% to 1.1±1.9%, and MetHb level can be measured with in the deviation 0.7±1.3%. Optimization of wavelengths and more experiments will improve the accuracy of POM for HbV.

Keywords

pulse oxymeter, blood substitutes, interference effect, light scattering

はじめに

人工酸素運搬体であるHb小胞体 (HbV) について、動物投与試験から優れた酸素運搬機能と安全性が実証されてきた¹⁾。臨床現場で使用することを想定した場合に、人工酸素運搬体投与前後の生体モニターの継続とモニタリング精度の保障、投与された人工酸素運搬体の機能のモニタリングを確保することが、Medical Engineering (ME) に関連する課題の一つとして重要である。人工酸素運搬体の光学的特性が血液とは異なるため、検査項目によっては従来法では測定が困難となる場合がある。事実、血液生化学検査においても、修飾Hb溶液、HbV、パールフオロカーボン乳剤の投与後、採血液から血球を分離した血清・血漿中にこれら人工酸素運搬体が残存するため、比色法や比濁法による測定において干渉作用を示す²⁾。しかし、HbVの場合は、比重が大きいので、超遠心分離、或は高分子量デキストランを添加して遠心分離することで透明な血清・血漿が得られ、干渉作用を回避できることが確認されている³⁾。また、自動輸血検査器による血液型検査でも、HbVによる干渉作用の存在が確認され⁴⁾、注意を要する。

青柳ら (日本光電工業) が1974年に世界に先駆けて開発したパルスオキシメータ (POM) は、経皮的・非侵襲的に動脈血液のみの酸素飽和度 (deoxy-oxy二成分系) と心拍数を計測でき、救急医療、集中医療の現場で呼吸管理に利用され、その有用性も十分に認知されており⁵⁾、現在では各社製品が世界中で使用されている。人工酸素運搬体の臨床試験が行われている米国では既に、修飾Hb溶液を投与した場合のPOMに対する影響が検討され、POMが正確な酸素飽和度を示さない場合があることが報告されており、その対処法が求められている⁶⁾。従ってHbVを投与した場合も、その影響を明らかにする事と、影響がある場合の対処策を考える必要がある。HbVはメトヘモグロビン (MetHb) 還元酵素系を有しないため、次第にHbが酸化し、比較的早い時間にMetHbが増大するが⁷⁾、POMは二成分系の測定を前提としているので、血中にMetHbが存在すると実際の酸素飽和度よりも高く表示されることになる⁸⁾。また、

HbVは粒子径250 nmであり、赤血球に比較して極めて小さい。その微粒子分散系は血管内、毛細血管内において血漿層中に均一に分散することが微小循環動態の観察から明らかになっているので⁹⁾、光散乱により生体組織の吸光度測定においても干渉作用を呈する可能性がある。そこで本研究では、現行のPOMを使用した場合のHbVの干渉作用の程度を確認するとともに、HbV投与後も酸素飽和度およびMetHb含量を正確に測定できる新しいPOMの開発を目的とした。

方法

1. 計測装置に用いる検出波長の決定法

POMの原理であるパルス分光法は、分光分析の基本理論であるLambert-Beerの法則を生体に応用したものである。生体組織を透過しやす近赤外光を用い、入射光に対する透過光の低下分を、吸光度として測定する。組織には静脈血の吸収、組織による吸収、光散乱もある。しかし、動脈血は常に拍動しているため、心臓の拡張期と収縮期では動脈血の量が変化するので、心臓の拡張期と収縮期では動脈血の量が見ていることになる。これが動脈血酸素分圧のみを見る原理となる。

まず、Hb諸成分の可視光-近赤外スペクトル (既知, Fig. 1) をもとに、Lambert-Beerの法則を利用し、式 (1) から波長*i*, *j* における減光度比を計算し、濃度の変化に対して相関の高い減光度比を理論的に検討した¹⁰⁾。

$$\Phi_{ij} = \frac{\Delta A_i}{\Delta A_j} = \frac{E'_{O_2Hb} \cdot C_{O_2Hb} + E'_{RHb} \cdot C_{RHb} + E'_{COHb} \cdot C_{COHb} + E'_{MetHb} \cdot C_{MetHb}}{E''_{O_2Hb} \cdot C_{O_2Hb} + E''_{RHb} \cdot C_{RHb} + E''_{COHb} \cdot C_{COHb} + E''_{MetHb} \cdot C_{MetHb}} \quad (1)$$

ここで、E: 吸光係数 (dl/g/cm), C: 濃度 (g/dl) (添字: O₂Hb=酸素化ヘモグロビン, RHb=還元ヘモグロビン, COHb=一酸化炭素ヘモグロビン, MetHb=メトヘモグロビン), *i*, *j*: 測定波長 (nm, 610, 620, 660, 730, 805, 940) を意味する。式 (1) において、O₂Hbの濃度は60~100%, MetHbは1~40%, COHbは1%, RHbは1~40%とした。総

現行型POM (2波長): 660, 940 nm
改良型POM (4波長): 620, 660, 730, 940 nm

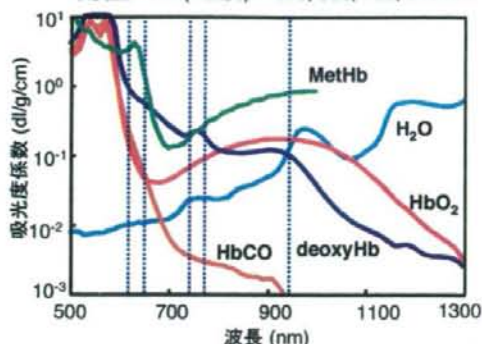


Fig. 1. Hb諸成分の可視-近赤外領域の吸収スペクトルと、既存POMと改良型POMの測定波長の位置。

Table 1. 改良型POMの測定波長を選択するための重回帰分析の結果。最も標準誤差が小さかった組合せは③であったが、660 nmと940 nmの2波長を含むと従来のPOMとの比較ができるので、②の4波長を選択した。

| 番号 | 組合せ4波長 (nm) | | | | 標準誤差 (%) | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|------------------|
| | $\lambda 1$ | $\lambda 2$ | $\lambda 3$ | $\lambda 4$ | MetHb | SpO ₂ |
| ① | 610 | 940 | 620 | 730 | 0.225 | 0.132 |
| ② | 660 | 940 | 620 | 730 | 0.337 | 0.135 |
| ③ | 805 | 940 | 620 | 730 | 0.109 | 0.147 |
| ④ | 660 | 940 | 620 | 805 | 0.659 | 0.982 |

ヘモグロビン濃度tHb=16 g/dlとし、各血液成分濃度をg/dlに変換してから式(1)に代入し、重回帰分析を行った (Table 1)。その結果、最も標準誤差が小さかった組合せは620, 730, 805, 940 nmであったが、他の組合せも十分に精度が良く、660 nmと940 nmの2波長が含まれていれば従来のPOMとの比較ができるため、620, 660, 730, 940 nmの4波長を選択した。

2. 改良型4波長光学システム

測定プローブ (TL-301P) に4波長LED (620, 660, 730, 940nm, 楕光波) を組み込み、DDGアナライザ (DDG-3300, 日本光電社, 東京) の内部ソフトウェアを改良して人工赤血球用のPOMを開発した。Fig. 2にその概要を示す。また4波長LEDの特性をTable 2に示す。

3. in vitro実験

HbVの光学特性に起因する干渉作用について検討することを目的としたin vitro実験を行った。HbVの粒子径 (250 nm) は赤血球 (8 μ m) に比べて小さく、更にPOMに使用される光源の波長よりも小さい。従って波長600~1300 nmの光の散乱特性が異なると予想され、HbV投与後にHbVの光学特性がPOMに干渉作用を与えると予想される。しかし、動物にHbVを投与する

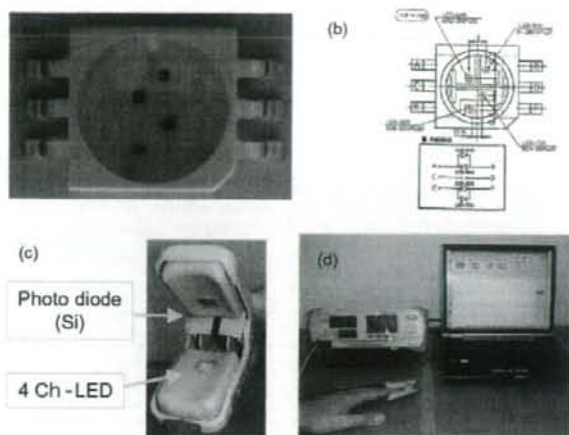


Fig. 2. 開発したPOMプローブの概要。(a) 4波長LED(楕光波)の概観、および (b) 基板図面、(c) 開発したプローブ、(d) 人工赤血球用POMの概観

Table 2. 4波長LED特性 (W.L.: Wavelength, Po: Total Output Power, Vf: Forward Voltage, λ_p : Peak Wavelength, $\Delta\lambda$: スペクトル半値幅)

| W.L. (nm) | 940 | 660 | 620 | 730 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| Po(mW) | 3.24 | 5.12 | 1.86 | 3.49 |
| Vf (V) | 1.2 | 1.8 | 1.9 | 1.6 |
| λ_p | 944.0 | 657.6 | 621.6 | 732.9 |
| $\Delta\lambda$ | 45.8 | 24.4 | 20.2 | 28.8 |

場合、干渉作用の原因を生理的な現象なのか、光学特性であるか特定できない。そこで、血液循環シミュレータを用いてHbVを血液に混合する実験を行い、生理的な条件を排除し、血液の光学特性のみに着目した。

使用した血液循環シミュレータ (Fig. 3) は、拍動ポンプ (Centrimag Blood Pumping System, Levitronix, Massachusetts, USA)、脈動フローセル、人工肺 (泉工医科工業株) から構築した (循環容量: 約120 ml)。血液循環シミュレータは水に浸し、多用途加熱&保温ヒーター (SCH-901, クマガイ電工株)、熱電対 (TR-1101-100, 楕アドバンテスト)、Thermal Arraycorder (WR7800, グラフテック株) を用い37°Cに維持した¹⁾。血液循環シミュレータに豚血液 (tHb=6.1 g/dl) を充填し、拍動流で循環させた。ポンプ出口の圧力は収縮期で100~130 mmHg、拡張期で70~100 mmHgとし、流量は470~500 ml/minとした。

5%アルブミン溶液に分散させたHbVを、リン酸緩衝生理食塩水で希釈し、200 ml (4.9 g/dl) として使用した。後述の動物実験ではビーグル犬の総Hb濃度 約10 g/dlに対し、投与HbV濃度が8.6 g/dlなので、これと混合比を同じにするため、豚血液のHb濃度 6.1 g/dlに対しHbVのHb濃度を4.9 g/dlとした。

循環している豚血液をHbVで段階的に置換し、POMの酸素飽和度表示の変化を調べた。置換量は内容量の0%, 20%, 40%, 60%とした。人工肺では純酸素をガス交換させ、酸素飽和度を理論上ほぼ100%に維持した。

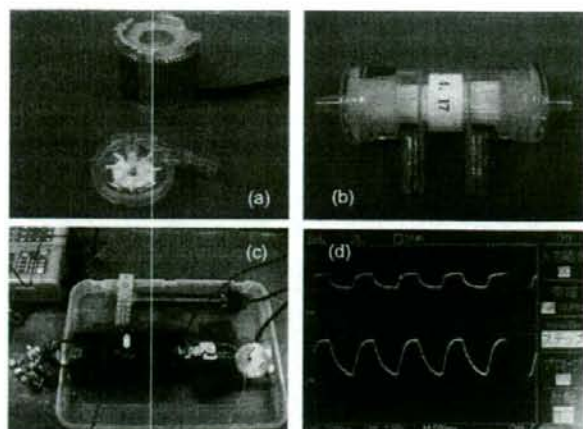


Fig. 3. 血液循環シミュレータの構築. (a) 拍動ポンプ (Centrimag Blood Pumping System, Levitronix, Massachusetts, USA), (b) 動物実験用の小型人工肺 (泉工医科工業㈱), (c) 血液循環シミュレータの外観, (d) 血液循環シミュレータにより得られた圧力および流量波形の一例.

4. 動物実験

慶應義塾大学呼吸器外科にて、ビーグル犬(雄, 7頭, 体重 $7.2 \pm 0.3\text{kg}$) を用いてHbV投与実験を行った¹⁾. ビーグルは人工呼吸器 (MODEL SN-480-3, ㈱シナノ製作所) を用いてセボフルレン 2~3% 麻酔下で安静状態に維持し, 一回換気量は約 140ml, 換気回数は20回/分程度とした. ビーグル犬の循環血液量の40%を脱血し, 1時間経過してから5%リコンビナントアルブミンに分散させたHbV溶液 (8.6 g/dL) を同量投与した. 脱血前, HbV投与直後, 投与2時間後, 投与4時間後のそれぞれについて, 吸気酸素濃度FiO₂を0.2, 1.0, 0.15と調整することによりSaO₂を変化させた. ビーグル犬の舌に4波長光学システムのプローブを取り付け, SaO₂およびMetHbの変化に対する各波長の減光度を連続的に測定した.

採血液を基にした酸素飽和度の測定には, 血液ガス測定装置 (CO-Oximeter, ABL555, Radiometer) より測定した動脈血酸素分圧PaO₂もとに, 赤血球とHbVの既存の酸素解離曲線 (Fig. 4, ヘモックスアナライザーにより測定) に照らし合わせ, 赤血球とHbVそれぞれの酸素飽和度を得た. そして赤血球とHbVの混合比率の実測値から, 動脈血の酸素飽和度を算出した.

混合比率の算出方法は, 先ず, 採血液を小型遠心機 (チビタン-R, 2,000G, 6,200 rpm, コスモ・バイオ㈱) を用いて遠心分離し, 赤血球とHbVを含有する血漿層に分けた. 全血のHb濃度と血漿層のHbV由来のHb濃度をシアノメトヘモグロビン法により得た. ヘマトクリット値をもとに, 血液中の赤血球由来Hb濃度とHbV由来のHb濃度を求め, 混合率を算出した.

採血液中のHbV由来MetHb濃度は, 紫外可視分光光度計を用い, 脱酸素条件下で測定した波長405, 430 nmにおける吸光度の比から算出した¹⁾.

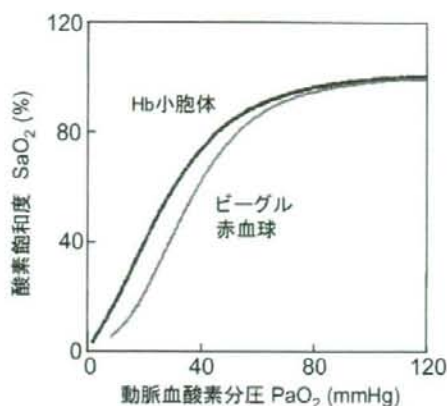


Fig. 4. HbVとビーグル犬の赤血球の酸素結合解離曲線. ヘモックスアナライザーにより測定 (37℃).

5. 解析法

4波長光学システムで計測した各波長の減光度比から酸素飽和度, およびMetHb濃度を求める計算式の構築には重回帰分析を用いた. 重回帰式から求めた血液成分濃度を本法の測定値とした. 本法の測定値と採血による測定値を比較し, 本法の精度を検証した.

4波長光学システムで計測した減光度比から酸素飽和度およびMetHbを求める計算式を構築するために, 動物実験に用いたビーグル犬7頭のうち, ビーグル犬4頭のデータを用いて重回帰分析を行った. 計算式構築に用いたビーグル犬4頭のデータ (28データ) をTraining setと呼ぶ. 独立変数は最大で6個とし, 偏相関係数が最も小さい独立変数を計算式から除外し, 独立変数の個数を1個ずつ減少させた. 独立変数の個数が1~6個それぞれの計算式における相関係数, AIC (Akaike's Information Criterion: 統計的モデルを観測値と理論値の差 (残差) を用いて評価する統計量. 値が小さいほど当てはまりが良い), 自由度調整済み寄与率 (大きい方が良い) を求め, 最適な計算式決定の指標とした. 決定した計算式の再現性を確認するために, 残りのビーグル犬3頭のデータ (27データ) に構築した計算式を適応した. 再現性を確認したビーグル犬3頭のデータをValidation setと呼ぶ.

結果および考察

1. HbVのバルスオキシメータに対する光学的干渉作用の解明
*in vitro*実験におけるHbV置換比と現行型POM表示の関係をFig. 5に示す. 血液をHbVで段階的に置換すると, POMが表示する酸素飽和度は低下する傾向を示した. つまり, HbVの光学的干渉作用により, 現行型POMは酸素飽和度を過小評価する. 各測定波長における減光度変化を追加したところ, HbVの混合割合の増加に伴い, 各波長の減光度が増加した. 特に波長620 nmの減光度の増加が顕著であり, 次いで波長660 nmの増加が大きかった. 物質に光が照射されると反射・透過・回折が同時に起こる (まとめて光散乱と呼ぶ). 透過光には多重屈折

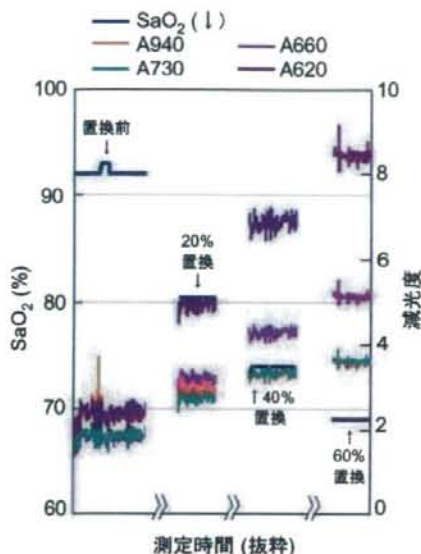


Fig. 5. 血液循環シミュレータ (*in vitro*実験) におけるHbV置換量に対するPOMの酸素飽和度表示、および4波長の減光度変化。

によるものも含まれる。大粒子による散乱光は前方に集中し、小粒子の場合はランダムに散乱する。従って、HbVにより血液中には小さい粒子が増加し、前方散乱光が減少する。その結果、各波長で減光度が増加したと考えられる。つまり、現行型POMが酸素飽和度を過小評価した要因は、HbVの混合による減光度の変化が要因と言える。Fig. 5において、波長660 nmは940 nmに比べてHbV投与による減光度の増加率が大きい。現行型POMは波長660 nmと940 nmの減光度比 ϕ から酸素飽和度を求めている。従って、波長660 nmの減光度が940 nmの減光度よりも増加すれば、減光度比 ϕ は増加する。既報のPOMにおける酸素飽和度と減光度比 ϕ との関係より¹⁵⁾、減光度比 ϕ が増加すれば、酸素飽和度は減少する。

2. パルスオキシメータの精度と4波長光学システムの有効性

HbV投与前後における、現行型POMによる酸素飽和度SpO₂と採血による酸素飽和度SaO₂の関係、および誤差をFig. 6に示す。動物実験でも*in vitro*実験と同様に、HbV投与後に現行型

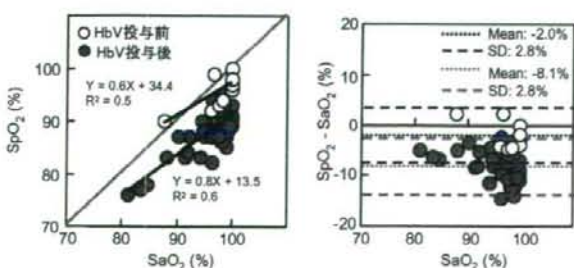


Fig. 6. HbV投与前後における、(a)POMによる酸素飽和度SpO₂と採血による酸素飽和度SaO₂の関係、および (b) 誤差

Table 3. 酸素飽和度の各計算式における統計量

| 各独立変数の偏相関係数 | $\phi_{660/940}$ | $\phi_{660/730}$ | $\phi_{620/660}$ | $\phi_{730/940}$ | $\phi_{620/940}$ | $\phi_{620/730}$ |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | $\phi_{660/940}$ | -0.32 | -0.62 | -0.72 | -0.67 | -0.63 |
| $\phi_{660/730}$ | 0.25 | 0.69 | 0.65 | 0.59 | × | × |
| $\phi_{620/660}$ | 0.14 | 0.32 | × | × | × | × |
| $\phi_{730/940}$ | 0.74 | 0.75 | 0.72 | 0.67 | 0.44 | × |
| $\phi_{620/940}$ | -0.16 | -0.39 | -0.34 | × | × | × |
| $\phi_{620/730}$ | -0.01 | × | × | × | × | × |
| 偏差平方和S _E | 113.57 | 113.60 | 126.13 | 142.41 | 219.94 | 273.18 |
| サンプル数N | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| 独立変数の数n | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| 相関係数 | 0.73 | 0.73 | 0.704 | 0.665 | 0.483 | 0.358 |
| AIC | 134.67 | 132.67 | 133.60 | 135.00 | 145.17 | 149.24 |
| 自由度調整済みの寄与率 | 0.657 | 0.673 | 0.652 | 0.624 | 0.442 | 0.334 |

POMは酸素飽和度を過小評価することが分かった。

酸素飽和度の各計算式における統計量をTable 3に示す。酸素飽和度の最適な計算式として、 $\phi_{660/940}$ 、 $\phi_{660/730}$ 、 $\phi_{620/660}$ 、 $\phi_{730/940}$ 、 $\phi_{620/940}$ の5つの独立変数が選択された。5つの独立変数による計算式を式(2)に示す。

$$SpO_2 = -90.0 - 150.1 \times \phi_{660/940} + 144.2 \times \phi_{660/730} + 25.2 \times \phi_{620/660} + 225.6 \times \phi_{730/940} - 42.0 \times \phi_{620/940} \quad (2)$$

Training setにおける採血による酸素飽和度SaO₂と改良型4波長POMによる酸素飽和度SpO₂の関係および誤差をFig. 7 (上)に示す。Training setでは0.0±2.1%の精度で酸素飽和度を計測できた。Validation setにおける採血による酸素飽和度SaO₂と改良型4波長POMによる酸素飽和度SpO₂の関係および誤差をFig. 7 (下)に示す。Validation setでは1.1±1.9%の精度で酸素飽和度を計測できた。

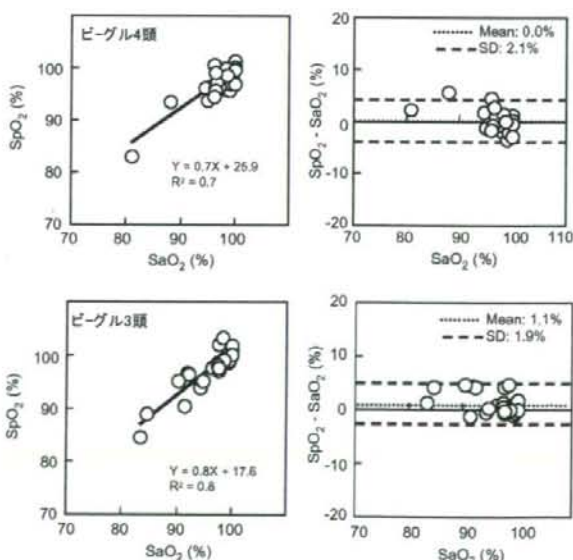


Fig. 7. 採血液から測定・算出した酸素飽和度SaO₂と、改良型4波長POMによる酸素飽和度SpO₂の関係および誤差 (上) Training set. (下) Validation set.

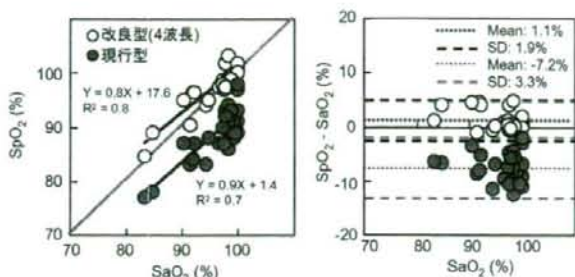


Fig. 8. 現行型POMおよび改良型4波長POMにおける、採血による酸素飽和度SaO₂とパルス分光法による酸素飽和度SpO₂の関係および誤差。

Table 4. MetHbの各計算式における統計量

| 各独立変数の偏相関係数 | φ660/940 | φ660/730 | φ620/660 | φ730/940 | φ620/940 | φ620/730 |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 0.11 | -0.17 | -0.21 | -0.05 | -0.10 |
| 偏差平方和S _E | 46.70 | 46.83 | 47.232 | 47.51 | 49.21 | 49.25 |
| サンプル数N | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| 独立変数の数n | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| 相関係数 | 0.41 | 0.41 | 0.403 | 0.4 | 0.378 | 0.378 |
| AIC | 109.78 | 107.86 | 106.10 | 104.27 | 103.25 | 101.27 |
| 自由度調整済みの寄与率 | 0.242 | 0.274 | 0.300 | 0.325 | 0.329 | 0.354 |

現行型POMと改良型4波長POMの酸素飽和度計測の精度を同じデータと比較した。それぞれの採血による酸素飽和度SaO₂とパルス分光法による酸素飽和度SpO₂の関係および誤差をFig. 8に示す。POMによる酸素飽和度の計測精度が7.2±3.3%であったのに対し、改良型4波長POMの酸素飽和度の計測精度は1.1±1.9%であった。4波長にすることによって、HbVの干渉作用を緩和できたと言える。

MetHbの各計算式における統計量をTable 4に示す。メトヘモグロビンの最適な計算式として、φ620/730の1つの独立変数が選択された。1つの独立変数による計算式を式(3)に示す。

$$\text{MetHb}_p = -5.9 + 4.1 \times \phi_{620/730} \quad (3)$$

Training setにおける採血によるMetHb_sと改良型4波長POMによるMetHb_pの関係および誤差をFig. 9(上)に示す。Training setでは0.0±1.4%の精度でMetHbを計測できた。Validation setにおける採血によるMetHb_sと改良型4波長POMによるMetHb_pの関係および誤差をFig. 9(下)に示す。Validation setでは-0.1±1.1%の精度でメトヘモグロビンを計測できた。

現行型POMのHbV投与量に対する酸素飽和度計測の精度に対し、4波長光学システムの導入により、HbVの干渉作用に対する補正効果が得られた。HbV投与に対するPOMの精度をFig. 10(a)、現行型POMと改良型4波長POMの精度比較をFig. 10(b)に示す。血液交換率40%で酸素飽和度の平均値は約6%異

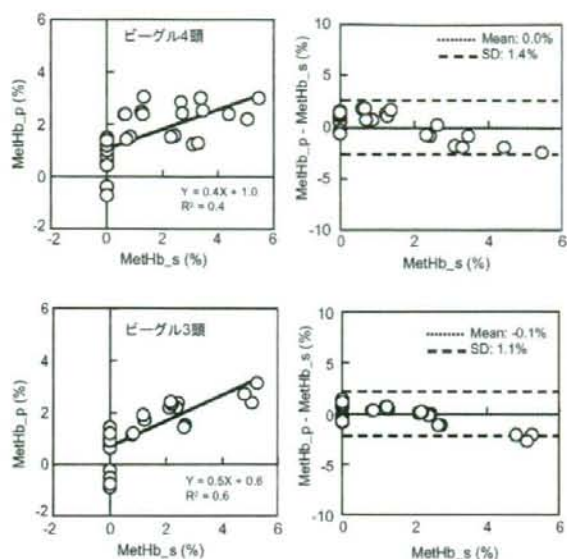


Fig. 9. 採血液から測定・算出したMetHb_sと、改良型4波長POMによるMetHb_pの関係および誤差。(上) Training set。(下) Validation set。

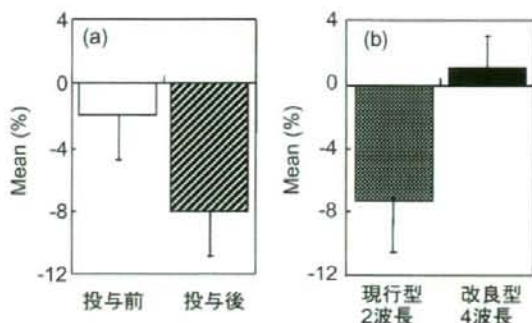


Fig. 10. (a) HbV投与に対する現行型POMの酸素飽和度計測の精度。(b) 現行型POMと改良型4波長POMの酸素飽和度計測の精度比較。

なるのに対し、分散は同程度の変化である。投与量によって平均値だけが変化するのであれば、投与量によって現行型POMの酸素飽和度表示を読み変える方法も考えられる。しかし、MetHb計測には式(3)より波長620, 730 nmが必要である。MetHbによる現行型POMへの干渉作用もあることから、HbV投与時の呼吸管理には4波長が必要と思われる。またHbV投与によるPOMへの干渉作用を緩和するために、4波長パルス分光法は有効であったと言える。

結論

HbVは、現行の日本光電社製のPOM (DDG-3300) に対し光学的な干渉作用を示し、酸素飽和度を過小評価することが解り、臨床応用に際しての新たな問題の提起となった。今後、他社製のPOMについても干渉作用の有無を確認する必要がある。し

かし、その原因は極めて明らかであり、対応策は今から検討する必要がある。今回開発した4波長光学システムは、酸素飽和度とMetHbを計測でき、HbVによるPOMへの干渉作用の緩和、およびMetHb濃度の計測に有効であった。但し、今回得られた計算式は経験式であり、測定部位やHbVの投与量によって変化する可能性があるため、今後更なる検討が必要である。

謝 辞

動物実験の補助をしていただいた大竹 俊男 氏（慶應義塾大学医学部 動物実験センター）に感謝致します。本研究は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサンエンス総合研究事業）により推進された。

引用文献

1. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Haemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: present situation and future visions. *J Intern Med* 2008;263:4-15.
2. Ma Z, Monk TG, Goodnough LT, McClellan A, Gawryl M, Clark T, Moreira P, Keipert PE, Scott MG. Effect of hemoglobin- and Perflubron-based oxygen carriers on common clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1997;43:1732-7.
3. Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, Takeoka S, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Pretreatment of serum containing hemoglobin vesicles (oxygen carriers) to prevent their interference in laboratory tests. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:222-31.
4. 酒井宏水, 富山賢一, 政田陽平, 武岡真司, 堀之内宏久, 小林 絃一, 土田英俊. 酸素輸液（ヘモグロビン小胞体）を含有する血液の生化学検査. *人工血液* 2002;10:47-53.
5. 三宅誠司, 大橋康広, 高折益彦. ヘモグロビン基剤人工酸素運搬体混入血液での血液型判定 とくに自動輸血検査器について. *人工血液* 2007;15:85-89.
6. Aoyagi T, Kishi M, Yamaguchi K, Watanabe S. Improvement of the ear piece oximeter. 13th Meeting of the Japanese Society for Medical Electronics and Biological Engineering. Abstract, 1974:90-91.
7. Teng X, Zhang Y. Blood oxygen saturation measurement. In: *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*. M. Akay (Ed.), pp. 605-612. 2006. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
8. Hughes GS, Francorn SF, Antal EJ, Adams WJ, Locker PK, Yancey EP, Jacobs EE. Effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on percent oxygen saturation as determined with arterial blood gas analysis and pulse oximetry. *Ann Emerg Med* 1996;27:164-9.
9. Lurie F, Driessen B, Jahr JS, Reynoso R, Gunther RA. Validity of arterial and mixed venous oxygen saturation measurements in a canine hemorrhage model after resuscitation with varying concentrations of hemoglobin-based oxygen carrier. *Anesth Analg* 2003;96:46-50.
10. Atoji T, Aihara M, Sakai H, Tsuchida E, Takeoka S. Hemoglobin vesicles containing methemoglobin and L-tyrosine to suppress methemoglobin formation in vitro and in vivo. *Bioconjug Chem* 2006;17:1241-5.
11. Suzuki H, Kobayashi N, Nagaoka T, Iwasaki K, Umezumi M, Takeda S, Togawa T. Noninvasive measurement of total hemoglobin and hemoglobin derivatives using multiwavelength pulse spectrophotometry -In vitro study with a mock circulatory system. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2006;1:799-802.
12. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* 1998;40:66-78.
13. Noiri E, Kobayashi N, Takamura Y, Iijima T, Takagi T, Doi K, Nakao A, Yamamoto T, Takeda S, Fujita T. Pulse total hemoglobinometer provides accurate noninvasive monitoring. *Crit Care Med* 2005;33:2831-5.
14. 池田達彦, 堀之内宏久, 井澤菜緒子, 河野光智, 泉陽太郎, 渡辺真純, 川村雅文, 宗慶太郎, 酒井宏水, 土田英俊, 小林 絃一. Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存の評価. *人工血液* 2007;15:18 (abstract)
15. 鶴川貞二. POM. 検査法の基礎. *検査と技術* 1994;22:11-16.

人工赤血球の過去，現在，未来

酒井宏水

Hiromi SAKAI

早稲田大学理工学研究所准教授

土田英俊

Eishun TSUCHIDA

早稲田大学理工学研究所名誉教授

1 はじめに

血液型がなく、感染源を一切含まず、長期間備蓄して利用可能な人工赤血球の実現が待たれている。いわゆる修飾ヘモグロビンは、欧米で臨床試験が行われているが副作用も明らかになってきている。これは赤血球構造の生理的意義を重要視しなかったためといえる。日本では、赤血球構造を模倣したヘモグロビン小胞体を中心に開発され、輸血代替としての効能と安全性が明らかにされている。この人工赤血球を活用すれば、我が国の現行医療に目覚ましい変革をもたらすであろう。

2 修飾ヘモグロビンとヘモグロビン小胞体

血液の中に存在するタンパク質の中で一番多いのがヘモグロビン(Hb)、2番目がアルブミンである。Hbは赤血球の中に濃度高く存在し酸素を結合するタンパク質であり、アルブミンは血漿タンパク質の主要成分であり膠質浸透圧を呈し循環血液量を維持することを主な役割としている。献血由来の赤血球は日本では冷蔵保存の期限が3週間であるが、アルブミンは極めて安定で、60℃の加熱処理を経てなお長期間の室温保存に耐える。ごく最近、我が国で遺伝子組換えアルブミンが世界に先駆けて臨床認可されたことは誠に喜ばしいことであり、その開発者に敬意を表したい。さて、酸素運搬の役割を担う赤血球の代替物の開発については、歴史的には1898年に赤血球からHbを単離してそのまま投与する単純な発想から始まったが、当然のことながら様々な副作用に遭遇し、1960年代からはHbに化学的修飾を加えた溶液が開発され、現在臨床試験が進んでいる。遺伝子組換えHbの試みもある。ミミズなど

の下等動物では、Hbは細胞膜で覆われておらず、裸の状態が存在している。しかし高等動物では、Hbは理由があって赤血球の中に濃度高く内包されている。裸のHb溶液では赤血球の機能を代替することは実は簡単ではない。

2008年4月末に、米国Bethesdaにて、FDA主催のワークショップ(Hbを用いる人工酸素運搬体)が開催された。最大の話題は、JAMA誌に報告されたcell-free Hb-based oxygen carriers(HBOCs)の臨床試験のメタアナリシスについて¹⁾。参加者の大多数にとっては何とも憂鬱な結果であった。Cell-free HBOCsとはヒト献血液由来Hb、あるいはウシHbに化学的修飾を加えた修飾Hb(分子内架橋Hb、重合型polyHb、ポリエチレングリコール(PEG)結合型)であり(図1)、北米の5社がしのぎを削って開発してきた。サブユニットへの解離の防止、分子量を増大させて血中滞留時間を延長させるなど、分子状Hbの難点を克服することを狙ったものである。メタアナリシスでは、臨床試験の結果をまとめた論文13報、そのほか3件の公開データをもとに3,711人分のデータを解析したところ、cell-free HBOCs投与群と対照群(生理食塩水の投与など)の比較では、死亡率及び心筋梗塞の発症率がHBOCs群で高くなるという驚きの結果であった。動物実験の段階で十分な安全性評価がなされていなかったために、今になって副作用が明らかになった? ICHガイドラインの非臨床動物実験はHBOCsの安全性試験には向いていない? 企業も臨床試験の全データを公表しておらずFDAも知らないデータがあり得る? 患者(被験者)を救うために臨床試験を早期に中止すべきだったのでは? 等の議論があった。1990年代にBaxter社が分子内架橋Hbを大々的に展開し、以前から血管収縮と血圧亢進のことが問題になっていたが、phase IIIでようやくそれを重篤な

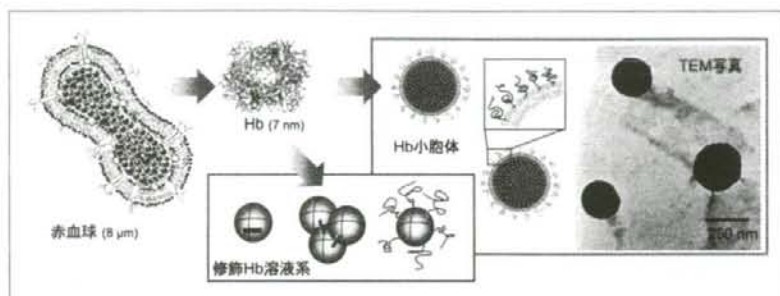


図1 ヘモグロビン(Hb)を用いる人工赤血球

Hb小胞体は、期限切れ赤血球より精製単離した高純度Hbをリン脂質2分子膜で被覆する。さらに粒子表面はPEG鎖で修飾する。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解る。他方、修飾Hb溶液系は、左から分子内架橋Hb、重合Hb、PEG結合Hbなどがあり、欧米で臨床試験が進められている。

副作用として認め、撤退に至った経緯がある。重合型Hbであれば、このような副作用は回避できると考えられていたが、それが困難になってきたのである。

ところで我々は、赤血球構造の重要性を信じ、いわゆる“cellular-type”「細胞型」のHb小胞体を研究しているが、^{2,3)}赤血球の細胞型構造の生理的意義を理解すれば、上述のcell-free HBOCsに副作用が生じたことは容易に理解できる。赤血球は直径約8 μmの中窪み円盤状粒子であり、タンパク質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。Hb溶液が赤血球膜で覆われている理由は、①本来様々な毒性のあるHbの逸脱、血管壁との直接的な接触の抑制、②腎臓の糸球体からの漏出など血管外漏出を防ぎ血中滞留時間を長くする、③35%濃厚Hb溶液の高い粘度と膠質浸透圧の抑制、⁴⁾④Hb機能維持のための各種リン酸化化合物などエネルギー分子、解糖並びに還元-酵素系の保持、⑤血管内皮弛緩因子(NO, CO)との反応性の制御などの役割もある。⁵⁾また、⑥血液(血球分散系)は非Newton流体で体内循環、特に末梢血管内における特色ある流動形式と生理作用が特性である。

Hb溶液のカプセル化は、歴史的には1950年代からChangらが高分子膜を用いて試みた。日本でも1960年代に木本、神原らが挑戦した。⁶⁾1960年代後半に両親媒性分子であるリン脂質が水中で2分子膜を形成しこれが小胞構造(リポソーム)に成るこ

とがBanghamによって報告され、1970年代にDjordjevicらは、リポソームにHbを内包した“synthetic erythrocyte”を報告した。米国海軍研究所や日本のグループも試みたが、粒径制御など調製の困難さ、血漿タンパク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。その後、リン脂質2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を組込んで、Hb小胞体を完成させた(表1)。⁷⁻⁹⁾高純度・高濃度Hb溶液(濃度35%以上、約3万個のHb分子)を脂質分子二層膜(厚さ5 nm)で包んだ小胞体(平均粒径250 nm)は、脂質成分とHbが分子間相互作用(2次的相互作用:疎水の相互作用、静電的相互作用、水素結合など)だけで形成している分子集合体である。原料のHbは日本赤十字社から提供されるNAT検

表1 人工赤血球(Hb小胞体)の特徴

| |
|--|
| 赤血球膜成分を完全に除去し、血液型物質なし 感染源なし(60℃加熱処理・限外濾過膜) |
| 高濃度Hb溶液(>35 g/dl)を粒子内に保持する 小粒径(250 nm)・血漿中に均一分散する |
| 分子状Hbの副作用を脂質膜で回避する |
| 脱酸素化して長期室温保存が可能 |
| 血液適合性が良い、代謝・排泄が容易である |
| 赤血球と同等の酸素運搬機能がある |
| 物性値の任意調節が可能 |

査済みの献血由来の期限切れ赤血球由来であるが、精製に際し Hb に一酸化炭素を結合させて安定化し、60℃、10 時間の加熱処理とウイルス除去膜処理の組合せで、感染に対する安全性を確保できる。¹⁰ 当初、分子内にジエン基を有する重合性リン脂質を用い、小胞体構造の安定化をはかったが、¹¹ その後、体内蓄積性の問題があった。現在では方法を換え、約 1,500 本の PEG を粒子表面に配置することにより小胞体粒子間の凝集抑制と分散安定度の向上の効果が得られ、さらに脱酸素化して容器に封入することにより溶液のまま室温にて長期保存が可能になった。¹² 「ナマモノ」の血液から高純度 Hb 溶液を単離し、これを人工赤血球という安定な「物質」に再生したといえる。

3 輸血代替としてのヘモグロビン小胞体の酸素運搬機能

Hb 小胞体を輸血代替として利用するにあたり重要な点は、まず赤血球と同様に Hb 小胞体粒子分散液は膠質浸透圧を持たない、したがって、大量投与に際しては循環血液量を維持するために、血漿増量剤の添加が必要となる。例えば、最近認可された 5% 遺伝子組換えアルブミン (rHSA) 水溶液に分散させた場合の膠質浸透圧は 20 mmHg、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、血漿中に均一分散でき、またアロステリック因子の内包で血液と同等の酸素結合解離曲線を呈することも重要である。慶應義塾大学医学部(小林絏一名誉教授)のグループとの共同研究では、Hb 小胞体でラットの循環血液量の実に 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を実証している。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ラットは全例が生存し、ヘマトクリット(赤血球体積分率)が 1 週間で完全に回復した。¹³ Hb 小胞体は最終的に細網内皮系 (RES) に捕捉され、安全に分解、排泄される。したがって、臨床では術前血液希釈、術中出血分の補給、さらに胸部外科手術における人工心肺(体外循環回路)の補充液としての利用が十分に期待できる。¹⁴ 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及ぼすとされており、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。

出血性ショック時の蘇生液としての利用も検討され、赤血球と同等の酸素運搬機能を主にげつ菌類を使用した実験で実証している。例えば、麻酔状態の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 5% rHSA に分散させて投与すると、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た。¹⁵ その後の 14 日間の観察では、ヘマトクリットが正常値に戻ることを確認した(図 2)。現在、ビーグルを用いた出血性ショック蘇生試験も開始しており、概ね良好な成績が得られている。これらの結果は、Hb 小胞体が医療現場にて使用できるようになれば、特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し、同種血輸血の回避、または必要量の低減が可能と成ることを意味する。

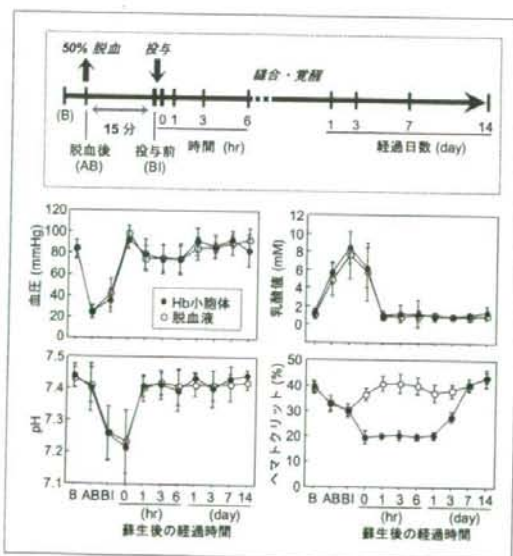


図 2 出血性ショック状態にあるラットの蘇生試験

循環血液量の 50% を脱血してショック状態とした後、Hb 小胞体を rHSA に分散させた溶液を投与した。6 時間後に覚醒させてその後 14 日間観察した。脱血液の投与と同等の回復を示し、低下したヘマトクリットも 1 週間以内に回復した。

4 酸素治療剤としての活用(テーラーメイド人工赤血球)

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(図3)。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と考えられる。しかし、血管性障害により十分な血流が行き届かない組織(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ため、動脈血はこの領域に到達する前に既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。¹⁵⁾ Hb小胞体の酸素親和度はアロステリック因

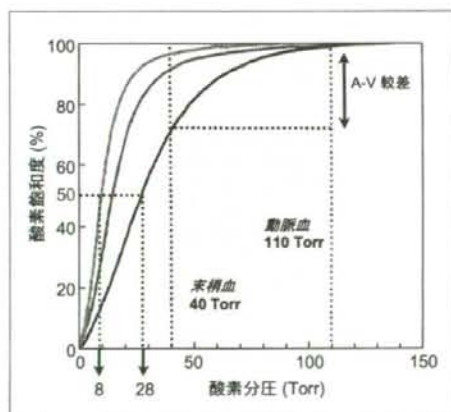


図3 Hb小胞体の酸素結合解離曲線

一番右側の曲線は、図2の実験で用いたHb小胞体のもの。酸素親和度(P_{50} 値: Hbが酸素を50%結合するときの酸素分圧)は、28 Torrであり、ヒト血液と同等である。 P_{50} 値はアロステリック因子の添加量で調節が可能で、一番左側の曲線は、アロステリック因子を全く添加しない場合で、 P_{50} 値は8 Torrとなる。この場合、正常組織では酸素は放出しないが、虚血性領域にまで酸素を確実に運搬することが期待される。

子の内包により自在に調節できる。赤血球よりも小粒径のHb小胞体(250 nm径)は、血漿中に均一に分散しているので、赤血球が行き届かない狭窄部を経由して到達できる。このような仮説のもと、これまでにハムスター有蓋皮弁虚血モデルにおいて、高酸素親和度Hb小胞体(P_{50} =8~15 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確認した(ベルン大学との共同研究)。したがって、酸素治療剤としての適応症、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利用が期待できる。他方、Hb小胞体がラット固形癌の組織酸素分圧を上昇させ、感受性を高める結果が最近得られた。小粒径であるHb小胞体は、がん組織内の複雑な血管内に到達し、血管外漏出することで酸素が効率よく運搬された。この場合は、 P_{50} は血液と同等がよいと考えられている(慶應義塾大学医学部との共同)。

P_{50} 値のみならず、分子集合体としてのHb小胞体はその物性値を様々な値に調節することが可能なので、各々の適応に相応しいテー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性の実証

1. 循環動態の恒常性

欧米で開発が進められている修飾Hb溶液系では、血圧の異常亢進や食道の蠕動運動の障害など副作用が明らかになっている。これは血管内皮由来弛緩因子である一酸化窒素(NO)との高い親和度起因すると考えられている。ハムスター皮下微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。¹⁶⁾ 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危険性がある。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。現在の理解としては、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、直径 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。

肝臓中では肝実質細胞にある hemoxygenase がヘムを分解する。この際に産生する CO が、血管弛緩因子として作用する。摘出肝灌流中の微小循環動態の検討では、類洞血管の孔(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 CO を捕捉して類洞血管の不連続的狭窄を生じるが、Hb 小胞体では粒径が 250 nm と大きいので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。この粒子径が極めて重要であることを実証する結果である。

2. 体内動態と代謝過程

Hb 小胞体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。体内に投与された Hb 小胞体は、酸素運搬の役目を終えると肝臓、脾臓、骨髄など RES のマクロファージに捕捉され徐々に代謝・排泄されることが、ラジオアイソトープ法による体内動態観察から明らかにされた。¹²⁾ 貪食能に一過性の変動は見られるものの、組織病理学的検討(ラット)から Hb 小胞体は 7 日以内に、代謝産物である鉄や脂質類は 14 日以内に消失することが実証され、老化赤血球の代謝経路と同様と考えている。¹³⁾ また、約 1 週間後には赤血球量は正常値にまで回復しており、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。新薬の非臨床試験において安全度確認のための項目の 1 つに、反復投与試験がある。ラットに対して Hb 小胞体の反復投与(投与量 10 ml/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。¹⁴⁾

条件の向上と、移植までの時間経過との勝負で決まる。臓器保存液としては、UW 液など電解質、糖質、代用血漿剤の混合液が使用されている。酸素溶解度の高いパーフルオロカーボン液と電解質液の 2 層の間に脾臓や腸など比較的平たい臓器を浸漬し、酸素ガスの拡散によって臓器組織に酸素を供給する two-layer method では良好な成績を得ている。もし摘出臓器に、血液と同様の液体が血管を通して灌流されれば、酸素は組織の隅々にまで確実に運搬され、電解質や栄養分の補給、代謝産物や老廃物の除去も可能であり、臓器保存時間を飛躍的に延長することが期待できる。我々はこれまでに Hb 小胞体で、動物から摘出した心臓・肝臓・小腸などの灌流を行い、各臓器の諸機能が数時間は保持されることを確認している。²⁾

再生医療に関する実用的な目覚ましい展開の 1 つに、岡野らの温度感応性ポリマーによる細胞培養用シートの完成がある。得られる筋芽細胞シート(細胞単層の厚さ)を何枚か重ねて心筋外壁から移植する治療法が試され、血管新生や壁厚の増大が確認されている。また、患者の口腔粘膜に含まれる幹細胞をもとに培養シートを作製し、角膜上皮細胞疲弊症の患者に移植する臨床研究が進められている。細胞増殖には栄養分と酸素の供給及び老廃物など、代謝産物の除去が必要であるが、体外で 3 次的に、しかもより大きな組織形成を目指す場合には、血管構築(血管新生)と同時に、血液に代わる成分の灌流が必要となろう。細胞増殖を組織形成にまでつなげるには、血液に代わる代替物が必要になるのではと考えている。血管生理では、血液の流れによって血管壁に生じる剪断応力の存在が極めて重要とされている。血液のヘモレオロジーに対比させた Hb 小胞体の濃厚分散液のレオロジー・デザインが求められており、既に Hb 小胞体と各種代用血漿剤の組み合わせで、溶液粘弾性の調節が可能となっている。さらに、細胞増殖に必要な栄養源、電解質、成長因子など、溶液全体としてのデザインが今後必要になろう。

6 臓器移植と組織再生への利用の可能性

摘出臓器移植後の生着率は、摘出してからの保存

7 日本のプライオリティと人工赤血球の実現に向けた取組み

眞島らは 1950 年代に完全合成系の人工酸素運搬

体を目指し、コバルト-ヒスチジン錯体を用いた「人工血液」を試みた。²¹ パーフルオロカーボン(PFC)の液体の中で呼吸する写真が *Science* 誌に掲載(Clark ら, 1966年)された後、ミドリ十字社がPFCを乳化したFluosol-DAを開発し、世界で初めてFDA認可(1990年)された華々しい出来事があった(しかし十分な酸素運搬機能が得られなかったために、1993年に製造を中止)。²² 味の素社が開発したPEG修飾ピリドキサル化Hb(PHP)は、米国で臨床試験の実施許可(1992年)が出た最初の修飾Hbである。²³ 合成ヘムを用いたりピドヘム小胞体,²⁴ アルブミン-ヘムの新規化合物,²⁵ そして今回ここに取り上げたHb小胞体など,²⁶ 常に日本から新しい物質が誕生し続けている。

実は1985年頃から厚生省血液研究事業として「期限切れ赤血球の有効利用」の観点から、Hbを用いる人工酸素運搬体の研究が開始され(血液製剤の規格及び試験法に関する研究:主任研究者、松橋直),味の素のPHPも評価された。北海道赤十字血液センター(故 関口定美前所長)は、ピリドキサル化修飾Hbなどを検討した。1993年には厚生省血液研究事業として「代替血液製剤に関する研究班」(主任研究者:故 関口定美)が組織され、人工血液全般に関する調査研究が行われ、²⁷ 1997年から厚生科学研究費補助金(高度先端医療研究事業)として「人工血液」の研究が強力に推進されるようになり、「人工赤血球」「人工血小板」「人工免疫グロブリン」「造血幹細胞」「遺伝子組換え蛋白質製剤」の研究班に分かれ実現に向けた取組みが進んだ。また、我が国は薬害問題や阪神淡路大震災を経験し、血液製剤の安定供給を目指す方針が掲げられ、2002年改正薬事法:衆議院厚生労働委員会決議(医薬品・医療機器の安全対策推進に関する件)には、「五.人工血液についてはその有効性及び安全性が確保されたものの製品化が促進されるよう、研究開発の促進をはかること」が明記され、国策として推進されるようになった。献血血液の供給体制の整備(集約化)で、期限切れ赤血球が減少しており(2006年:44,900本)、人工赤血球の原料が減少していると言える。しかし、期限切れは潜在的にもっとあるといわれており、医療機関で発生する期限切れ赤血球すべてを

1か所に効率よく回収し、有効利用するシステムの構築が必要になろう。また、現在ではNAT検査済み期限切れ赤血球を用い、徹底したウイルス不活化/除去工程を採用しているが、「特定生物製剤」としての人工赤血球は輸血より安全なのか、未知の感染源の可能性はないのか、遡及調査の必要性など検討をする必要がある。他方、組換えHbを使用すれば、原料の問題は克服できる可能性がある。事実、米国ではSomatogen社が組換えHb(変異型)を開発した経緯がある。遺伝子組換えHb小胞体の調製は技術的には可能である。しかしそれでも「生物製剤」に分類されると考えられ、また人工赤血球は現行の献血輸血システムを「補完」するものであり、「期限切れ赤血球の有効利用」は重要な課題として残る。

さらに、人工赤血球は従来の医薬品と比較してその投与量は非常に多く、製造法や安全性試験法についても新たな概念が必要であり、日本血液代替物学会としても指針の作製に着手した。²⁸ このように、人工赤血球の開発には多くの課題があり、厚生労働省、日本赤十字社、その他関連機関と綿密に協議しまた協力を得て、人類の健康福祉の増進の役割を担う、意義のある本研究を進めていく必要がある。

参考文献

- 1) Natanson C. et al., *J. Am. Med. Assoc.*, 299, 2304-2312(2008).
- 2) Sakai H. et al., *J. Intern. Med.*, 263, 4-15(2008).
- 3) 土田英俊, *ファルマシア*, 28, 1101-1105(1992).
- 4) Sakai H. et al., *Bioconjugate Chem.*, 11, 56-64(2000).
- 5) Sakai H. et al., *J. Biol. Chem.*, 283, 1508-1517(2008).
- 6) 本本誠二ほか, *外科治療*, 19, 324-332(1968).
- 7) Sakai H. et al., *Biotechnol. Prog.*, 12, 119-125(1996).
- 8) Takeoka S. et al., *Langmuir*, 12, 1755-1759(1996).
- 9) Sou K. et al., *Biotechnol. Prog.*, 19, 1547-1552(2003).
- 10) Sakai H. et al., *J. Biochem.*, 131, 611-617(2002).
- 11) Sakai H. et al., *Bioconjugate Chem.*, 11, 425-432(2000).
- 12) Sakai H. et al., *Transfusion*, 46, 339-347(2006).
- 13) Yamazaki M. et al., *Circulation*, 114(1 Suppl.), I 220-I 225(2006).
- 14) Sakai H. et al., *Crit. Care Med.*, 32, 539-545(2004).
- 15) Plock J. A. et al., *Crit. Care Med.*, 35, 899-905(2007).
- 16) Sakai H. et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 279, H 908-H 915(2000).
- 17) Sou K. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312, 702-709(2005).
- 18) Sakai H. et al., *Am. J. Pathol.*, 159, 1079-1088(2001).
- 19) Sakai H. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 311, 874-884(2004).
- 20) 巽島 高, *外科治療の進歩*, 5, 246-257(1957).
- 21) 薄場 彰, *人工血液*, 2, 9-14(1994).
- 22) Iwashita Y., *Artif. Organs Today*, 1, 89-114(1991).
- 23) Huang Y. et al., *Biomaterials*, 27, 4477-4483(2006).
- 24) 関口定美, *人工血液*, 4, 85-89(1996).
- 25) 高折益彦, *人工血液*, 13, 104-111(2005).

Artificial Oxygen Carriers, Hemoglobin Vesicles and Albumin–Hemes, Based on Bioconjugate Chemistry

Eishun Tsuchida,*[†] Keitaro Sou,[†] Akito Nakagawa,[†] Hiromi Sakai,[†] Teruyuki Komatsu,^{†,‡} and Koichi Kobayashi[§]

Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, Tokyo 169-8555, Japan, PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST), and Department of General Thoracic Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan. Received October 10, 2008; Revised Manuscript Received December 10, 2008

Hemoglobin (Hb, Mw: 64 500) and albumin (Mw: 66 500) are major protein components in our circulatory system. On the basis of bioconjugate chemistry of these proteins, we have synthesized artificial O₂ carriers of two types, which will be useful as transfusion alternatives in clinical situations. Along with sufficient O₂ transporting capability, they show no pathogen, no blood type antigen, biocompatibility, stability, capability for long-term storage, and prompt degradation in vivo. Herein, we present the latest results from our research on these artificial O₂ carriers, Hb-vesicles (HbV) and albumin–hemes. (i) HbV is a cellular type Hb-based O₂ carrier. Phospholipid vesicles (liposomes, 250 nm diameter) encapsulate highly purified and concentrated human Hb (35 g/dL) to mimic the red blood cell (RBC) structure and eliminate side effects of molecular Hb such as vasoconstriction. The particle surface is modified with PEG-conjugated phospholipids, thereby improving blood compatibility and dispersion stability. Manipulation of physicochemical parameters of HbV, such as O₂ binding affinity and suspension rheology, supports the use of HbV for versatile medical applications. (ii) Human serum albumin (HSA) incorporates synthetic Fe²⁺ porphyrin (FeP) to yield unique albumin-based O₂ carriers. Changing the chemical structure of incorporated FeP controls O₂ binding parameters. In fact, PEG-modified HSA-FeP showed good blood compatibility and O₂ transport in vivo. Furthermore, the genetically engineered heme pocket in HSA can confer O₂ binding ability to the incorporated natural Fe²⁺ protoporphyrin IX (heme). The O₂ binding affinity of the recombinant HSA (rHSA)-heme is adjusted to a similar value to that of RBC through optimization of the amino acid residues around the coordinated O₂.

1. INTRODUCTION

Transfusion of donor blood is currently an indispensable routine procedure in modern medical treatments because the risk of transmission of viral illness has become extremely low. Nevertheless, this level of safety has been achieved at great cost and hepatitis virus or unknown pathogens cannot be excluded completely, even by the nucleic acid amplification test (NAT) system. Furthermore, the transfusion of donor blood necessitates cross matching and compatibility tests to avoid a hemolytic reaction in the recipient, and the donated red blood cells (RBCs) must be refrigerated at 4 °C (up to 3 weeks in Japan). These requirements limit the availability of blood transfusion in disaster or emergency situations.

During the past several decades, various artificial O₂ carriers have been synthesized and studied for as RBC substitutes by many scientists in the fields of organic chemistry, inorganic chemistry, biochemistry, and polymer chemistry. These O₂ carriers are classified as perfluorocarbon-based materials, synthetic Fe²⁺ porphyrin-based materials, and Hb-based materials. In this review, we highlight recent developments of our research related to RBC substitutes of the latter two types.

Actually, Hb consists of four polypeptide chains (globin proteins), each of which has an Fe²⁺ protoporphyrin IX (heme) as a prosthetic group. The globin chain forms a compact globular conformation; the heme group is incorporated into the hydrophobic pocket with an axial coordination of histidine (*1*). On

exposure of the Hb solution to O₂, the heme forms a stable O₂ adduct complex. However, if the heme is eliminated from the globin wrapping, the heme complex is oxidized immediately and irreversibly to its Fe³⁺ state by proton-driven oxidation or μ -oxo dimer formation (*2*). In the 1970s and 1980s, much research was directed to mimic the O₂ carrier by synthesizing substituted porphyrin derivatives. In aprotic solvents, the proton-driven oxidation is excluded completely. Therefore, the remaining problem is how to suppress irreversible oxidation via dimerization. One successful approach was steric modification of porphyrin. Some superstructured Fe²⁺ porphyrins were prepared using an elegant organic synthesis technique (*2–4*). In particular, Collman reported that the tetrakis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -*o*-pivalamido)phenylporphyrinatoiron complex with 1-methylimidazole can reversibly bind O₂ in benzene at room temperature (*5, 6*). Nevertheless, these synthetic porphyrins were all oxidized irreversibly in aqueous media.

To create a hydrophobic environment in water, it is possible to use a bilayer membrane of a phospholipid vesicle instead of globin protein. In 1983, we synthesized an amphiphilic Fe²⁺ porphyrin having four alkylphosphocholine groups (lipid-heme), which is efficiently embedded into the bilayer of the phospholipid vesicle to yield a homogeneous hybrid. This lipidheme/phospholipid vesicle can bind and release O₂ under physiological conditions (Figure 1) (*7–9*). The 10 mM lipid-heme/phospholipid vesicle solution dissolves 29 mL O₂/dL compared to 27 mL/dL of human blood. Subsequent to that finding, we synthesized over 60 lipidheme molecules. A new lipidheme having four dialkyl-*sn*-glycerophosphocholine groups is self-organized in water to form self-assembled porphyrin bilayer vesicles without phospholipid (*10*). Furthermore, in 1995, we found that synthetic Fe²⁺ porphyrin bearing a covalently linked proximal base (FeP1) is incorporated into human serum

* To whom correspondence should be addressed. Eishun Tsuchida, Ph.D. Phone: +81-3-5286-3120. Fax: +81-3-3205-4740. E-mail: eishun@waseda.jp.

[†] Waseda University.

[‡] JST.

[§] Keio University.

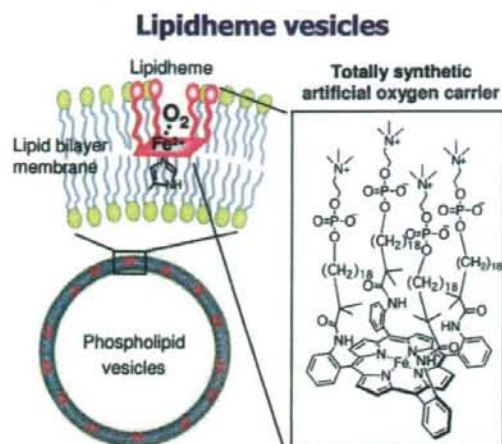


Figure 1. Lipidheme phospholipid vesicles as a totally synthetic artificial O_2 carrier (7).

albumin (HSA) and the obtained HSA-FeP1 hybrid coordinates O_2 in aqueous medium (11).

In 1985, we began the study of Hb-based O_2 carriers using purified human Hb aiming at the beneficial utilization of outdated RBC to support the present blood donation-transfusion system. This project has been supported for a long time by Japanese Red Cross Society and Ministry of Health and Welfare, Japan. On the basis of a fundamental concept that the cellular structure of RBC is necessary for O_2 transport in the bloodstream, we designed the phospholipid vesicle encapsulating Hb: the so-called Hb-vesicle. It has to be emphasized that the Hb-vesicle comprises a concentrated Hb solution and four kinds of natural and synthetic lipids that assemble to form a hierarchical corpuscle structure (molecular assembly) through the well-regulated secondary interactions, such as hydrophobic and electrostatic interactions. To date, chemically modified Hb of several types have been developed as RBC substitutes or O_2 therapeutic reagents. Herein, we review the latest developments of our research into Hb-vesicles and albumin-hemes.

2. HEMOGLOBIN VESICLES THAT MIMIC THE RBC CELLULAR STRUCTURE

2.1. Physiological Importance of Cellular Structure of RBC for Encapsulated Hb Design. Historically, stroma-free Hb isolated from RBCs were tested as a principal material for carrying O_2 . However, the plasma retention time of stroma-free Hb is particularly short (half-life of 0.5–1.5 h) because of the dissociation of the Hb tetramer ($\alpha_2\beta_2$; Mw, 64 500; 6.5 nm diameter) into dimers ($2\alpha\beta$), which are subsequently filtered by the kidney (12). Cell-free Hb-based O_2 carriers have been developed to overcome the problems of stroma-free Hb through chemical modification, "bioconjugation", of Hb molecules (Figure 2). They include intramolecularly cross-linked Hb (DCLHb) to prevent dimerization, recombinant cross-linked Hb produced by *E. coli*, polymerized Hb using glutaraldehyde or other cross-linkers, and polymer-conjugated Hb such as PEG-conjugated Hb and polysaccharide-conjugated Hb (13–21). During the long history of the development of cell-free Hb-based O_2 carriers (HBOCs), the many side effects of stroma-free Hb and chemically modified Hbs have been well-documented: renal toxicity; entrapment of gaseous messenger molecules (NO and CO) inducing vasoconstriction, hypertension, reduced blood flow, and reduced tissue oxygenation at microcirculatory levels (22–25); neurological disturbances; malfunction of esophageal motor function (18); myocardial

lesions (26, 27); and death (28). These side effects of Hb molecules underscore the importance of the large dimension of HBOCs or the RBC cellular structure. Retrospective and recent observations have indicated the main justifications for Hb encapsulation in RBCs: (i) a decreased high colloidal osmotic pressure (15); (ii) prevention of the removal of Hb from blood circulation; (iii) prevention of direct contact of toxic Hb molecules and the endothelial lining (29); (iv) retardation of reactions with endogenous NO and CO (24, 25, 30, 31) (Figure 3); (v) preservation of the chemical environment in cells, such as the concentration of phosphates (2,3-DPG, ATP, etc.) and other electrolytes; (vi) RBCs are the major component that renders blood as non-Newtonian and viscous, which is necessary to pressurize the peripheral artery for homogeneous blood distribution and for maintenance of blood circulation (32); (vii) the RBC cellular structure retards O_2 -release in comparison to acellular Hb solutions (33, 34), thereby retaining O_2 to peripheral tissues where O_2 is required. For those reasons, the optimal structure of Hb-based O_2 carriers might be to mimic the RBC cellular structure.

In 1957, Chang performed the pioneering work of Hb encapsulation to mimic the cellular structure of RBCs (35); microcapsules (5 μ m) were prepared using nylon, collodion, and other materials. Toyoda in 1965 (36) and the Kambara–Kimoto group in 1968 (37) also investigated encapsulation of Hbs with gelatin, gum arabic, silicone, and so forth. Nevertheless, results emphasized the extreme difficulty of regulating the particle size to be appropriate for blood flow in the capillaries and to obtain sufficient biocompatibility. After Bangham and Horne reported in 1964 (38) that phospholipids assemble to form vesicles in an aqueous medium and encapsulated water-soluble materials in their inner aqueous interior (39), it seemed reasonable to use such vesicles for Hb encapsulation. Djordjevic and Miller in 1977 (40) prepared liposome-encapsulated Hb (LEH) composed of phospholipids, cholesterol, fatty acids, and so forth. The US Naval Research Laboratories and collaborators demonstrated remarkable progress in the use of LEH (41–43). Terumo Corp. (Tokyo) developed different LEH, so-called Neo Red Cells (44, 45) (Table 1).

However, some intrinsic issues of encapsulated Hbs remained, which were related mainly to the nature of molecular assembly and particle dispersion. What we call Hb-vesicles (HbV), with their high-efficiency production processes and improved properties, were established by our group based on technologies of molecular assembly in concert with precise analyses of their pharmacological and physiological aspects (46–48) (Tables 2 and 3). We use stable carbonylhemoglobin (HbCO) for purification with pasteurization at 60 °C for 10 h. The purity of the obtained Hb solution is extremely high (49, 50). Use of the stable and purified HbCO enables concentration of the Hb solution to more than 40 g/dL using ultrafiltration and easy handling of Hb encapsulation using the extrusion method, without causing Hb denaturation. It has been confirmed that HbV encapsulates nearly 35 g/dL within a thin bilayer membrane. In final processing, CO of HbCO in HbV is photodissociated by irradiation of visible light under an O_2 atmosphere, and it converts to HbO_2 (51).

In fact, Hb autoxidizes to form metHb and loses its O_2 -binding ability during storage and during blood circulation (52–56). For that reason, metHb formation must be prevented. A method exists to preserve deoxygenated Hbs in a liquid state from using intrinsic characteristics of Hb: the Hb oxidation rate in a solution is dependent on the O_2 partial pressure; moreover, deoxyHb is not autoxidized at ambient temperatures (56). In the case of HbV, not only the encapsulated Hb but also the capsular structure (liposome) must be physically stabilized to prevent

Hemoglobin-based O₂ carriers

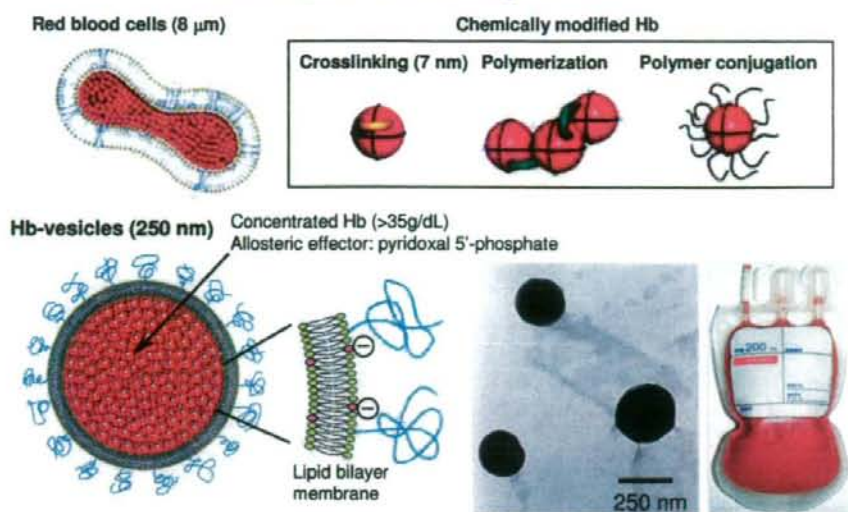


Figure 2. Schematic representation of a series of Hb-based O₂ carriers. Cross-linked Hb, polymerized Hb, and polymer-conjugated Hb are based on the chemical modification of Hb molecules (chemically modified Hbs). In the case of Hb-vesicles, a purified and concentrated Hb solution (35 g/dL) is encapsulated in phospholipid vesicles and the surface is modified using PEG chains. The particle size is well-regulated at 250 nm.

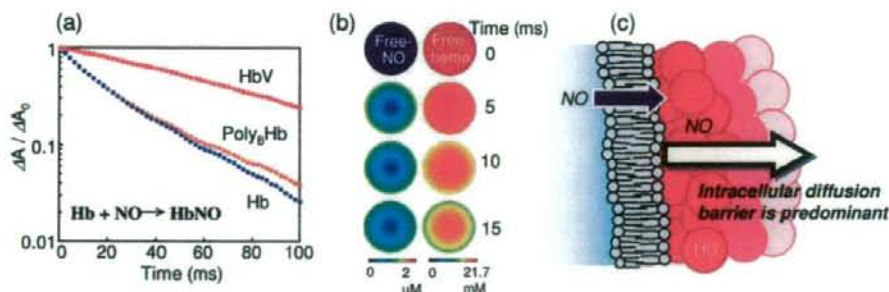


Figure 3. Encapsulation of Hb in vesicles retards NO binding. (a) Time courses of NO binding with HbV, human Hb with PLP (Hb/PLP = 1:2.5 by mol), and polymerized bovine Hb (Poly₉Hb) observed by stopped-flow rapid scan spectrophotometry. The level of reaction was plotted on a semilogarithmic graph as a ratio of absorption at 430 nm (ΔA) at time t , to the initial absorption (ΔA_0) at time 0. NO-bubbled PBS ([NO] = 3.8 μ M) and deoxygenated-Hb-containing solutions in PBS ([heme] = 3.0 μ M) were mixed (31). (b) Schematic two-dimensional representation of the simulated time courses of distributions of unbound free NO and unbound free heme in one HbV (250 nm). Both free NO and unbound hemes are distributed heterogeneously. The concentration changes gradually from the surface to the core, indicating formation of the intracellular diffusion barrier (30). (c) The phospholipid bilayer membrane cannot have any barrier function to gas diffusion. The determinant factor of retardation of NO-binding should be the intracellular diffusion barrier, which was induced by (i) intrinsically larger binding rate constant of NO to a heme in an Hb molecule, (ii) numerous hemes as sites of gas entrapment at a higher Hb concentration, (iii) a slowed gas diffusion in the intracellular viscous Hb solution, and (iv) a longer gas diffusion distance in a larger capsule.

irreversible intervesicular aggregation, fusion, and leakage of the encapsulated Hb.

In addition to HbV, new encapsulated Hbs without liposomes have emerged with the use of recent advanced nanotechnologies, such as polymersome (57) and PEG-poly(ϵ -caprolactone) copolymer nanoparticles (58). In vivo evaluation of O₂-carrying capacities of these new materials is anticipated. Encapsulation of Hb can reduce the toxicity of cell-free Hbs. However, numerous hurdles must be surmounted to realize encapsulated Hbs because of the components of the capsules themselves and their structural complexity as a molecular assembly. It is also important to consider the larger dosage requirement of encapsulated Hb for blood substitution than those of conventional drug delivery systems, which require no large dosage.

2.2. Structural Stabilization and Destabilization using Polymerization or PEG Conjugation. Liposomes, as molecular assemblies, have generally been characterized as structurally

unstable. The US Naval Research Laboratory tested the addition of cryoprotectants and lyoprotectants such as trehalose to LEH for its preservation as a powder without causing hemolysis after rehydration (59, 60). In addition, many researchers have developed stabilization methods for liposomes that use polymer chains (61–64). Polymerization of phospholipids that contain two dienoil groups (1,2-dioctadecadienoil-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; DODPC) was studied extensively by our group. For example, gamma-ray irradiation induces radiolysis of water molecules and generates OH radicals that initiate intermolecular polymerization of dienoil groups in DODPC. This method produces remarkably stable liposomes, resembling rubber balls, which are resistant to freeze–thawing, freeze–drying, and rehydration (65, 66). Actually, the polymerized liposomes were so stable that they were not degraded easily in the macrophages, even 30 days after injection (67). It became widely believed that polymerized lipids are inappropriate for intravenous injection.

Table 1. List of Representative Liposome-Encapsulated Hbs (LEH) Encapsulated Hbs Using Biodegradable Polymers

| product name | group |
|-----------------------------------|---|
| Hb vesicles (HbV) | Waseda Univ. and Keio Univ. |
| Neo Red Cells (NRC) | Terumo Corp. |
| artificial red cells (ARC) | NOF Corp. and Waseda Univ. |
| liposome-encapsulated Hb (LEH) | US Naval Research Laboratory |
| synthetic erythrocytes | Rush-Presbyterian-St. Luke's Medical Center, Univ. Illinois |
| Hb-loaded particles (HbP) | East China Univ. of Science and Technology |
| polymersome-encapsulated Hb (PEH) | The Ohio State Univ. |

sively Studied Aiming at Industrialization and Other Potential

| characteristics | current status |
|---|----------------|
| sterilization of HbCO at 60 °C for virus inactivation lipid composition to improve blood compatibility EG modification and deoxygenation for 2 yr storage [Hb] = 10 g/dL ositol hexaphosphate to regulate P_{50} (= 40–50 Torr) lipids: HSPC/cholesterol/fatty acid/PEG-lipid storage in a refrigerator for 6 months [Hb] = 6 g/dL | preclinical |
| polymerized lipids (DODPC) for stabilization storage in powdered or frozen state difficulty in degradation in RES freeze-dried powder with trehalose low Hb encapsulation efficiency thrombocytopenia, complement activation | suspended |
| first attempt of LEH | suspended |
| encapsulation by poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(ϵ -caprolactone-ethylene glycol) (PCL-PEG) double emulsion and solvent diffusion/ evaporation method biodegradable | basic study |
| self-assembly of amphiphilic diblock copolymers composed of poly(ethylene oxide) (PEO), poly(caprolactone) (PCL), and poly(lactide) (PLA) biodegradable and biocompatible | basic study |

Table 2. Physicochemical Characteristics of Hb Vesicles

| parameter | |
|---|--|
| particle diameter | 250–280 nm |
| P_{50} (O ₂) ^a | 25–28 Torr |
| [Hb] | 10 g/dL |
| [heme] | 6.2 mM |
| [metHb] | <3% |
| [HbCO] | <2% |
| suspending medium | physiologic saline solution (0.9% NaCl) |
| colloid osmotic pressure | 0 Torr |
| intracellular Hb concentration | ca. 35 g/dL |
| lipid composition | DPPC/cholesterol/DHSG/ DSPE-PEG ₅₀₀₀ |
| ζ potential ^b | –18.7 mV |
| weight ratio of Hb to lipids | 1.6–1.9 (w/w) |
| viscosity ^c | 3.8 cP |
| lamellarity | nearly 1 |
| stability for storage at room temperature | >2 years, purged with N ₂ |
| circulation half-life | 35 h (rats) |

^a Measured with a Hemox Analyzer (pH 7.4, 37 °C). ^b Measured with a Zeta-Sizer Nano ZS ([NaCl] = 20 mM, pH 7.4). ^c Measured with Anton Parr Rheometer M301 (268 s⁻¹, 25 °C).

Table 3. Characteristics of Hb-Vesicles As a Transfusion Alternative

- Human derived Hb solution is purified rigorously by pasteurization and ultrafiltration. The blood type antigens and pathogens are eliminated for utmost safety.
- Encapsulation of concentrated Hb solution (>35 g/dL), like RBCs.
- Small particle size (250 nm) for homogeneous distribution in the plasma phase of circulating blood.
- Shielding of the side effects of molecular Hbs by the lipid membrane.
- PEG modification for dispersion stability for long-term storage and in the bloodstream.
- Surface properties of HbV (PEG, negative charge, etc.) for blood compatibility.
- Prompt degradation and excretion of the components after entrapment in RES.
- Sufficient oxygen transporting capacity ([Hb] = 10 g/dL, cf. [Hb] of blood = 12–15 g/dL).
- Physicochemical properties are easily adjustable because of the nature of the "molecular assembly".

tion because of the difficulty in excretion. Subsequently, it was clarified that selection of appropriate lipids (phospholipid/cholesterol/negatively charged lipid/PEG-conjugated phospholipid) and that their composition is important to enhance the

stability of nonpolymerized liposomes (45, 68). Surface modification of liposomes with PEG-conjugated lipids is sufficient for dispersion stability (69). In fact, in comparison to RBCs, HbV is highly resistant to hypotonic shock, freeze–thawing, and enzymatic attack by phospholipase A₂ (70).

We investigated the possibility of long-term preservation of HbV during storage for two years through a combination of deoxygenation and PEG modification (71). As little as 0.3 mol % PEG-conjugated lipid stabilizes the dispersion state and prevents aggregation and fusion for two years through steric hindrance (71–73). The original metHb content (ca. 3%) before preservation decreased gradually to less than 1% after 1 month because of the presence of a reductant, such as homocysteine, inside the vesicles that consumed the residual O₂ and gradually reduced the trace amount of metHb. The rate of metHb formation was strongly dependent on the O₂ partial pressure: a lack of increase in the metHb formation was observed because of the intrinsic stability of the deoxygenated Hb. In fact, the metHb content did not increase for two years. These results suggest the possibility that the HbV suspension can be stored at room temperature for at least two years, which would enable stockpiling of HbV for any emergency.

2.3. Vesicular Surface Modification with PEG and Negative Charges for Blood Compatibility. Liposome is not a solute: it is a particle in a suspension. The particle surface might be recognized, leading to interaction with blood components including complements. The so-called *injection reaction*, or pseudoallergy, results from complement activation, giving rise to anaphylatoxins, which trigger various hypersensitivity reactions. This reaction is observed sometimes not only with liposomal products (74), but also with fat emulsions (75), and a perfluorocarbon emulsion (76). Therefore, examination of blood compatibility of encapsulated Hbs is important for clinical use. Transient thrombocytopenia and pulmonary hypertension in relation to complement activation is an extremely important hematologic effect observed in rodent models after infusion of LEH (containing DPPG: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol) developed by the US Naval Research Laboratory (77, 78) and other products. In our group, exchange transfusion of prototype HbV (containing DPPG, no PEG modification) in anesthetized rats engendered transient thrombocytopenia and slight hypertension (79). Similar effects were also observed for administration of negatively charged liposomes

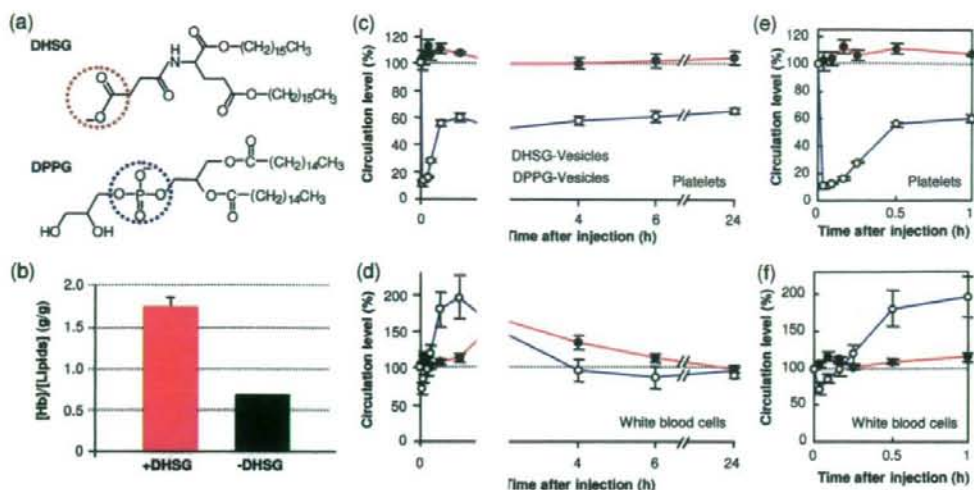


Figure 4. Effect of negatively charged vesicles on encapsulation and blood compatibility of HbV. (a) Chemical structures of negatively charged lipids, 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) and on encapsulation efficiency of Hb (35 g/dL). (b) Effect of DHSG on encapsulation efficiency of Hb (35 g/dL). (c–f) Circulation levels of HbV containing 9 mol % DHSG (DHSG-vesicles) or 9 mol % DPPG (DPPG-vesicles) in rats (lipids; 280 mg/kg body weight). The left side graphs show the initial fluctuations in platelets (c) and white blood cells (d), and the right side graphs show the initial fluctuations in platelets (e) and white blood cells (f).

(80, 81). The transient reduction in platelet counts caused by complement-bound liposomes was also associated with sequestration of platelets in the lung and liver. Such nonphysiological platelet activation probably engenders initiation and modulation of inflammatory responses because platelets contain several potent proinflammatory substances. A negatively charged lipid is required for encapsulating a large amount of Hb using a minimum amount of lipids (46–48). Therefore, we had to overcome the problem of conventional negatively charged vesicles to achieve blood compatibility. In the present formulation of HbV, we use a negatively charged lipid (DHSG: 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate) and confirmed the considerable improvement of Hb encapsulation efficiency (Figure 4a,b). It must be emphasized that the present vesicle formulation for HbV apparently does not induce thrombocytopenia or complement activation in animal experiments (Figure 4c–f) (82, 83), probably because the present HbV contains PEG-modification and a different type of negatively charged lipid (DHSG), not DPPG or a fatty acid.

Ikeda and his co-workers (83–86) thoroughly examined blood compatibility of HbV to human blood *in vitro*. The present PEG-modified HbV containing DHSG did not affect the extrinsic or intrinsic coagulation activities of human plasma, although HbV containing DPPG and no PEG modification tended to shorten the intrinsic coagulation time. The kallikrein-kinin cascade of the plasma was activated slightly by the prototype DPPG-HbV, but not by the present PEG-DHSG-HbV. The exposure of human platelets to high concentrations of the present HbV (up to 40%) *in vitro* did not cause platelet activation and did not adversely affect the formation and secretion of prothrombotic substances or proinflammatory substances that are triggered by platelet agonists. These results imply that HbV, at concentrations of up to 40%, has aberrant interactions with neither unstimulated nor agonist-induced platelets. It can be concluded that the present PEG-DHSG-HbV has higher blood compatibility.

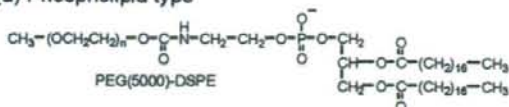
For surface modification of HbV with PEG chains, several PEG-conjugated lipids having amino acid backbone have been synthesized, as presented in Figure 5b,c (87, 88). For other applications, these PEG-conjugated lipids are available to modify the surfaces of not only HbV but also lipid vesicles. Because the PEG-lipids having a large hydrophilic group form thermo-

dynamically unstable self-assemblies, called micelles (73), they easily dissociate to monomers and spontaneously incorporate only to the outer surface of preformed HbV, as illustrated in Figure 5d (45, 72). Using this method, the required amount of PEG-conjugated lipid can be reduced by half or less because only the outer surface of HbV requires PEG chains. In addition, the PEG chains extending from the inner surface are expected to reduce the interior volume for encapsulation because of their exclusion volume effect. Therefore, modification only to the outer surface is important to encapsulate large amounts of Hb in lipid vesicles. To immobilize the hydrophilic macromolecules stably, such as PEG chains and proteins on lipid vesicles, a large hydrophobic anchor having a tetraacyl structure has been synthesized (Figure 5c,e). It has been confirmed that this hydrophobic anchor can stably immobilize PEG chains of high molecular weight (Mw 12 500) or water-soluble proteins (87, 89). These surface modification technologies and lipid chemistry have been applied to the development of other functional biomaterials (87–93).

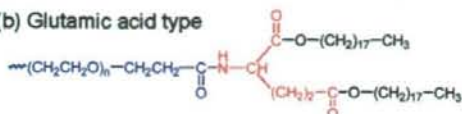
2.4. Circulation Time, Biodistribution, and Metabolism. The dosage of blood substitutes is expected to be considerably larger than those of other drugs, while their circulation time is considerably shorter than that of RBCs. Therefore, their biodistribution, metabolism, excretion, and side effects must be characterized in detail, especially in relation to the reticuloendothelial system (RES, alternatively, the mononuclear phagocytic system, MPS). Normally, free Hb released from RBCs is bound rapidly to haptoglobin and is consequently removed from circulation by hepatocytes. However, when the Hb concentration is greater than the haptoglobin binding capacity, unbound Hb is filtered through the kidney, where it is actively absorbed. Hemoglobinuria and eventual renal failure occur when the kidney reabsorption capacity is exceeded. The encapsulation of Hb in vesicles completely suppresses renal excretion. However, HbV in the bloodstream is ultimately captured by phagocytes in the RES in much the same manner as senescent RBCs are, as confirmed by radioisotope ^{99m}Tc -labeled HbV injection (42, 94). The circulation half-life is dose-dependent: for the dosage of 14 mL/kg body weight, the circulation half-life was 34.8 h in rats and 62.6 h in rabbits (Figure 6a). The HbV are finally distributed mainly in the liver,

Poly(ethylene glycol)-conjugated lipids

(a) Phospholipid type



(b) Glutamic acid type



(c) Lysine type

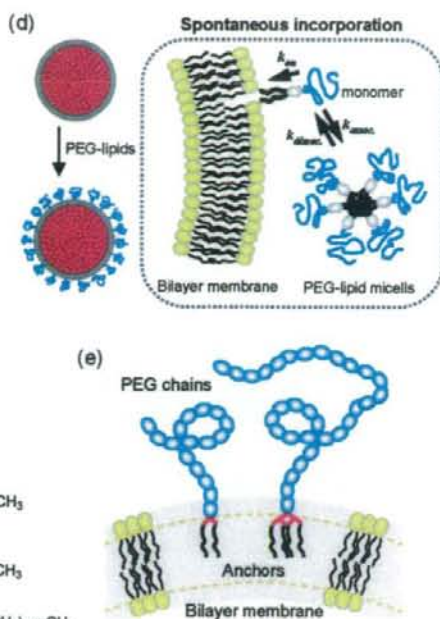
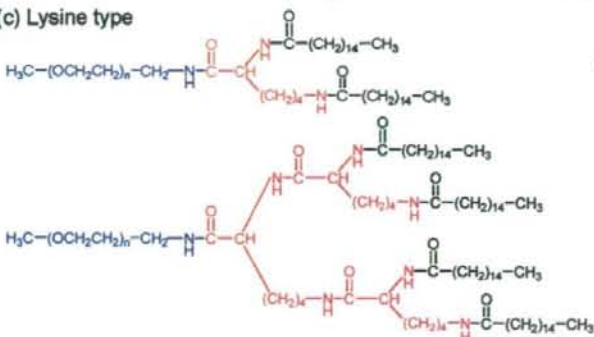


Figure 5. Surface modification of HbV with PEG chains. (a–c) Chemical structures of PEG-conjugated lipids. (a) PEG(5000)-DSPE is commercially available and widely used for surface modification of lipid vesicles. (b) Glutamic acid-type and (c) lysine-type PEG-conjugated lipids were reported previously (87, 88). (d) PEG-modification of the HbV using the spontaneous incorporation of a PEG-lipid into the bilayer membrane (72). (e) Immobilization of the large water-soluble polymers on the bilayer membranes (87, 89).

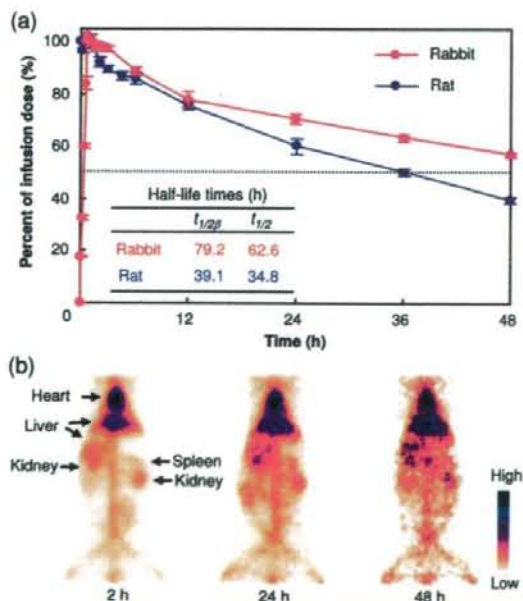


Figure 6. Circulation kinetics and organ distribution of HbV labeled with technetium-99m after top-loading intravenous infusion (14 mL/kg) in rats and rabbits (94). (a) Elimination profiles of HbV from blood. (b) Static gamma camera images of a rabbit acquired at 2, 24, and 48 h after HbV infusion.

spleen, and bone marrow (Figure 6b). The species-dependent circulation time is inferred to be dependent upon the species-specific weight balance of phagocyte organs, particularly the liver, spleen, and bone marrow, against body weight (94). The

circulation half-life in the case of the human body can be estimated as about 2–3 days at the same dosage.

It is generally accepted that the liposome clearance by RES at a small dosage is accelerated by opsonization (absorption of plasma proteins such as antibodies and complements on the liposomal surface). In fact, PEG-modification prevents opsonization for prolonged circulation times (95). However, considering a condition in which the dosage of HbV is extremely high and requires a considerable amount of opsonins, and in which HbV does not induce complementary activation (82, 83), then opsonin-dependent phagocytosis would not be a major component in the case of HbV with a large dosage. Actually, opsonin-independent phagocytosis, a direct recognition by macrophages, has been clarified in some studies (96, 97).

Analysis of the spleen by transmission electron microscopy (TEM) 1 day after infusion of HbV revealed the presence of HbV particles in the phagosomes of macrophages (98) (Figure 7). However, after 7 days, the HbV structure cannot be observed. We confirmed transient splenomegaly with no irreversible damage to the organs and complete metabolism within a week. The phagocytic activity transiently, but not completely, decreased 1 day after injection, and it turned to increasing at 3 days. The influence on the defense function and its mechanism has been carefully examined in the ongoing research. Immunohistochemical staining with a polyclonal anti-human Hb antibody was used as the marker of Hb in the HbV. Results clarified that HbV had almost disappeared in both the spleen and liver after 7 days.

Bilirubin and iron are believed to be released during metabolism of Hb, but our animal experiments of topload infusion, daily repeated infusions, and 40% blood exchange showed that neither of those products increased in the plasma within 14 days (99–101). Bilirubin would normally be excreted in the bile as a normal pathway; no obstruction or stasis of the bile is expected to occur in the biliary tree. Berlin blue staining

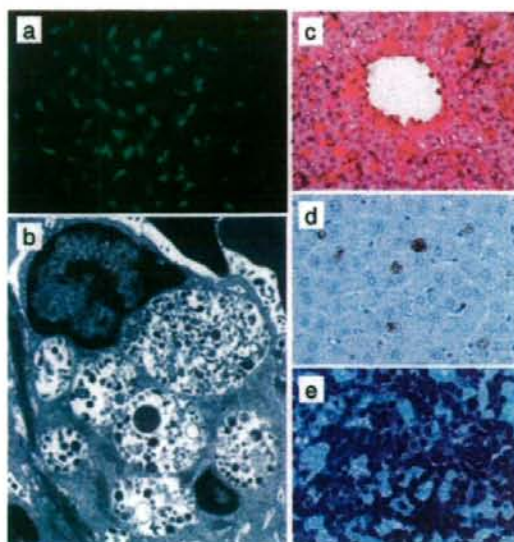


Figure 7. Histopathological examination of livers and spleens of rodents after injection of HbV. (a) Hamster liver 1 h after injection of fluorescence-labeled HbV, observed by a confocal laser scanning microscopy. The strong fluorescence indicates that HbV particles accumulate in Kupffer cells. (b) TEM of rat spleen macrophage 1 day after injection of HbV. The small black dots are HbV particles in phagosomes. The particles disappeared within a week (data not shown) (98). (c) Rat liver 1 day after injection of HbV. It was immunohistochemically stained with anti-human Hb antibody. The red parts indicate the presence of human Hb in HbV. It disappeared within a week (data not shown) (98). (d) Rat liver 7 day after injection of HbV. It was immunohistochemically stained with anti-methoxy-PEG antibody. The brown parts indicate the presence of PEG derived from PEG-lipid of HbV during the degradation. Fourteen days after injection, PEG was not detectable (data not shown) (102). (e) Rat spleen 3 days after 40% exchange transfusion with HbV. It was stained with Giemsa method. A large amount of blue cells, erythroblasts, are seen, indicating the enhanced hematopoiesis for the complete recovery of hematocrit within one week, while HbV are degraded in RES (101).

revealed considerable deposition of hemosiderin in the liver and spleen, even after 14 days. Moderate splenomegaly and hemosiderin deposition were also confirmed in the spleen after injection of stored RBCs, partly because of the accumulation and degradation of stored RBCs with lowered membrane deformability and shortened circulation half-life (101).

As for membrane components of Hb-vesicles, the plasma cholesterol level elevated transiently 3 days after injection: cholesterol was released from macrophages after degradation of HbV in phagosomes (99, 101). It was recently clarified using ^3H -cholesterol that cholesterol of HbV is released from macrophages to blood; it is ultimately excreted in feces. The PEG chain is widely used for surface modification of liposomal products. The chemical cross-linker succinic acid ester of PEG-conjugated phospholipid is susceptible to hydrolysis to release PEG chains during metabolism. Actually, immunohistochemistry using an anti-methoxy-PEG antibody clarified that PEG had disappeared from the liver and spleen in one week (102). The released PEG chains, which are known as inert macromolecules, are expected to be excreted in urine through the kidneys (103).

To determine the physiological capacity of RES for degradation of HbV, we tested massive intravenous doses by daily repeated infusion of 10 mL/kg body weight/day into Wistar rats for 14 days. The cumulative dosage was 140 mL/kg body weight (Hb and lipids, 20 689 mg/kg body weight). The total volume was equal to 2.5 times the total blood volume (56 mL/kg body weight) (100). Although splenohepatomegaly was considerable,

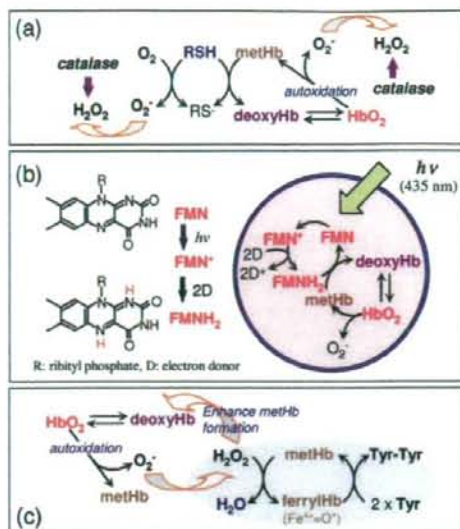


Figure 8. Artificial methHb reduction systems in HbV. (a) Coencapsulation of thiols (RSH), such as glutathione and homocysteine, reduces methHb. However, thiols react with O_2 to generate O_2^- and H_2O_2 . A more reactive thiol such as cysteine shows extremely rapid reaction with O_2 and adversely facilitates methHb formation. Coencapsulation of catalase effectively eliminates H_2O_2 and prevent such reactions (52, 53, 56). (b) Photoreduction system by coencapsulation of flavin mononucleotide (FMN) and an electron donor such as EDTA and methionine. Visible light irradiation (435 nm) primarily converts FMN to the photoexcited triplet FMN^* , and this reacts with two electron donors (D) to generate FMNH_2 . MethHb is rapidly reduced once FMNH_2 is produced (54). (c) During autoxidation of Hb and in blood circulation, H_2O_2 is a potent methHb enhancer. A combination of L-tyrosine (Tyr) and methHb effectively eliminates H_2O_2 and prolongs the functional lifetime of HbV (55).

all rats tolerated the infusions; their body weight increased during the succeeding 14 days until their intended sacrifice. The phagocytosed HbV had disappeared, though the considerable hemosiderin deposition was confirmed in the spleen, liver, kidney, adrenal gland, and bone marrow. We were unable to define a lethal dose of HbV in this experiment.

The profile of liposome clearance is species-dependent. More precise data are necessary to extrapolate the phenomena observed in animal experiments to humans. However, these results imply that the metabolism of HbV and excretion are within the physiological capacity that has been well-characterized for the metabolism of senescent RBCs and conventional liposomal products.

2.5. Regulation of O_2 Transporting Capability (MetHb Reduction, $P_{50}(\text{O}_2)$). Actually, Hb encapsulation provides a unique opportunity to add new functions to particles by coencapsulation or embedding of functional molecules (52–56, 104–106). MetHb formation of HbV during the preservation is completely prevented simply by deoxygenation. However, autoxidation of HbO_2 is initiated once HbV is administered into the bloodstream because the entire methHb enzymatic system is eliminated during the Hb purification for the utmost safety from infection. An artificial methHb reducing system is required to prolong the O_2 -carrying capacity of HbV. We have tested coencapsulation of reductants to directly reduce methHb and a photoreduction system using a photosensitizer such as flavin mononucleotide (FMN). A more practical method is to create an artificial enzymatic system using L-tyrosine (Tyr) and methHb that eliminates H_2O_2 as does catalase (Figure 8).

Without a chemical modification of Hb, O_2 binding affinity (expressed as $P_{50}(\text{O}_2)$, O_2 tension at which Hb is half-saturated