

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

Acknowledgements

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

References

- [1] T.M.S. Chang, Hemoglobin based red blood cells substitutes, *Artif. Organs* **28** (2004), 789–794.
- [2] H. Sakai, K. Tomiyama, K. Sou, S. Takeoka and E. Tsuchida, Polyethyleneglycol-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state, *Bioconjugate Chem.* **11** (2000), 425–432.
- [3] E. Frages, R. Grebe and M. Baumann, Viscoelastic and biochemical properties of erythrocyte during storage with SAG-M at +4 degrees C, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **27** (2002), 1–11.
- [4] Y. Suzuki, N. Tateishi, I. Cicha, M. Shiba, M. Muraoka, K. Tadokoro and N. Maeda, Decreased deformability of the X-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **22** (2000), 131–141.
- [5] L. Djordjevich, J. Mayoral, I.F. Miller and A.D. Ivankovich, Cardiorespiratory effects of exchange transfusions with synthetic erythrocytes in rats, *Crit. Care Med.* **15** (1987), 318–323.
- [6] H. Sakai, S. Takeoka, H. Yokohama, Y. Seino, H. Nishide and E. Tsuchida, Purification of concentrated Hb using organic solvent and heat treatment, *Protein Expression Purif.* **4** (1993), 563–569.
- [7] H. Sakai, K. Hamada, S. Takeoka, H. Nishide and E. Tsuchida, Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes, *Biotechnol. Progress* **12** (1996), 119–125.
- [8] H. Sakai, M. Yuasa, H. Onuma, S. Takeoka and E. Tsuchida, Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types, *Bioconjugate Chem.* **11** (2000), 56–64.
- [9] K. Sou, T. Endo, Y. Naito, S. Takeoka and E. Tsuchida, Efficient up-scale production of hemoglobin-vesicles (HbV) using the freeze-thawing and rapid extrusion, *Biotechnol. Progress* **19** (2003), 1547–1552.
- [10] S. Takeoka, Y. Teramura, T. Atoji and E. Tsuchida, Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation, *Bioconjugate Chem.* **13** (2003), 1302–1308.
- [11] Y. Izumi, H. Sakai, K. Hamada, S. Takeoka, T. Yamahata, R. Kato, H. Nishide, E. Tsuchida and K. Kobayashi, Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension, *Crit. Care Med.* **24** (1996), 1869–1873.
- [12] Y. Izumi, H. Sakai, T. Kose, K. Hamada, S. Takeoka, A. Yoshizu, H. Horinouchi, R. Kato, H. Nishide, E. Tsuchida and K. Kobayashi, Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model, *ASAIO J.* **43** (1997), 289–297.
- [13] H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi and E. Tsuchida, Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats, *Crit. Care Med.* **32** (2004), 539–545.
- [14] A. Yoshizu, R. Izumi, S. Park, H. Sakai, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Ikeda, E. Tsuchida and K. Kobayashi, Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicle, maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor-alpha, *ASAIO J.* **50** (2004), 458–463.

- [15] S. Wakamoto, M. Fujiwara, H. Abe, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Ikeda and K. Ikebuchi, Effects of PEG-modified hemoglobin vesicles on agonist induced platelet aggregation and RANTES release in vitro, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.* **29** (2001), 191–201.
- [16] H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, E. Ikeda, K. Sou, S. Takeoka, M. Suematsu, M. Takaori, K. Kobayashi and E. Tsuchida, Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311** (2004), 874–884.
- [17] K. Sou, R. Klipper, B. Goins, E. Tsuchida and W.T. Phillips, Circulation kinetics and organ distribution of hb-vesicles developed as a red blood cell substitute, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312** (2005), 702–709.
- [18] H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, M. Takaori, K. Kobayashi and E. Tsuchida, Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model, *Biomater.* **25** (2004), 4317–4325.
- [19] H. Sakai, H. Horinouchi, K. Tomiyama, E. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi and E. Tsuchida, Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in metabolism, *Am. J. Pathol.* **159** (2001), 1079–1088.
- [20] H. Sakai, A.G. Tsai, H. Kerger, S.I. Park, S. Takeoka, H. Nishide, E. Tsuchida and M. Intaglietta, Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin, *J. Biomed. Mater. Res.* **40** (1998), 66–78.
- [21] H. Sakai, A.G. Tsai, R.J. Rohlf, H. Hara, S. Takeoka, E. Tsuchida and M. Intaglietta, Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes: Influences of O₂ affinity, *Am. J. Physiol.* **276** (1999), H553–H562.
- [22] Z. Abassi, S. Kotob, F. Pieruzzi, M. Abouassali, H.R. Keiser, J.C. Fratantoni and A.I. Alayash, Effect of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats, *J. Lab. Clin. Med.* **129** (1997), 603–610.
- [23] S.M. Gardiner, A.M. Compton, T. Bennett, R.M.J. Palmer and S. Moncada, Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide, *Hypertension* **15** (1990), 486–492.
- [24] A.G. Tsai, B. Friensenecker, H. Sakai, H. Kerger and M. Intaglietta, Microcirculatory consequences of blood substitution with hemoglobin, in: *Blood Substitutes Physiological Basis of Efficacy*, R.M. Winslow, K.D. Vandegriff and M. Intaglietta, eds, Birkhauser, Boston, 1995, pp. 155–174.
- [25] D.H. Doherty, M.P. Doyle, S.R. Curry, R.J. Vali, T.J. Fattor, J.S. Olsen and D.D. Lemon, Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin, *Nat. Biotechnol.* **16** (1998), 672–676.
- [26] S. Moncada, R.M.J. Palmer and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* **43** (1991), 109–131.
- [27] H. Sakai, H. Hara, M. Yuasa, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida and M. Intaglietta, Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension, *Am. J. Physiol.* **279** (2000), H908–H915.
- [28] N. Makino, M. Suematsu, Y. Sugiura, H. Morikawa, S. Shiomi, N. Goda, T. Sano, Y. Nimura, K. Sugimachi and Y. Ishimura, Altered expression of heme oxygenase-1 in the livers of patients with portal hypertensive diseases, *Hepatology* **33** (2001), 32–42.
- [29] N. Goda, K. Suzuki, M. Naito, S. Takeoka, E. Tsuchida, Y. Ishimura, T. Tamatani and M. Suematsu, Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation, *J. Clin. Invest.* **101** (1998), 604–612.
- [30] H. Sakai, Y. Suzuki, M. Kinoshita, S. Takeoka, N. Maeda, and E. Tsuchida, O₂-Release from Hb-vesicles evaluated using an artificial O₂-permeable narrow tube: Comparison with RBC and acellular Hb, *Am. J. Physiol.* **285** (2003), H2543–H2551.
- [31] T.C. Page, W.R. Light, C.B. McKay and J.D. Hellums, Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an in vitro capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance, *Microvasc. Res.* **55** (1998), 54–66.
- [32] R.J. Rohlf, E. Bruner, A. Chiu, A. Gonzales, M.L. Gonzales, D. Magde, M.D. Magde, Jr, K.D. Vandegriff and R.M. Winslow, Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide, *J. Biol. Chem.* **273** (1998), 12128–12134.
- [33] D. Erni, R. Wettstein, S. Schramm, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leung and A. Banic, Normovolemic hemodilution with hemoglobin-vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue, *Am. J. Physiol.* **284** (2003), H1702–H1709.
- [34] C. Contaldo, J. Plock, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leung, A. Banic and D. Erni, Hemodilution with polymerized and encapsulated hemoglobins improves oxidative energy metabolism in collateralized hamster flap tissue, *Crit. Care Med.* **33** (2005), 806–812.
- [35] H. Sakai, P. Cabrales, A.G. Tsai, E. Tsuchida and M. Intaglietta, Oxygen releasing of Hb-vesicles with different P_{50S} from occluded arteriole in hamster skinfold window model, *Am. J. Physiol.* **288** (2005), H2897–H2903.

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⁽¹⁾, 小林紘一⁽¹⁾, 土田英俊⁽¹⁾

Teruyuki Komatsu⁽¹⁾, Yubin Huang⁽¹⁾, Rong-Min Wang⁽¹⁾, Akito Nakagawa⁽¹⁾, Hisashi Yamamoto^(2,3), Hirohisa Horinouchi⁽¹⁾, Koichi Kobayashi⁽¹⁾, 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_{MV}, 分子量 2 kDa (PEG_{2k}) または 5 kDa (PEG_{5k})] を反応させる方法、もしくは α -スクシニミド- ω -メトキシPEG [PEG_{SV}, 分子量 2 kDa (PEG_{2k}) または 5 kDa (PEG_{5k})] 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_{MV}(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_{MV}(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_{MV}(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)porphyratoiron(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_{2k}), 5-kDa (PEG_{5k})]. On the other hand, α -succinimidyl- ω -methoxy PEG [Mw: 2-kDa (PEG_{2k}), 5-kDa (PEG_{5k})] 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_{MV}(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, $[HSA] = 5 \text{ g dL}^{-1}$) 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 O_2 to FeXP, and stabilized the oxygenated complex. Furthermore, $PEG_{50k}(HSA-FeXP)$ exhibited a long circulation lifetime of FeXP in rats (13–16 h). The physiological responses to an exchange transfusion with $PEG_{50k}(HSA-Fe4P)$ 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 O_2 -transporting ability. In particular the $PEG_{50k}(HSA-FeXP)$ solution could be a promising material for entirely synthetic O_2 -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¹⁾。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²⁾。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³⁾。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⁴⁾、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た⁵⁾。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: 10^4 – 10^6 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 10^2 – 10^4 倍と高い)⁶⁾。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⁷⁾。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⁸⁾、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

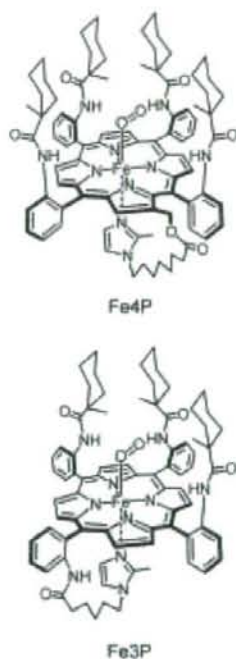


Chart 1. Structures of O_2 -adduct complexes of tetrakis(*o*-amidophenyl)porphyrinatoiron (II).

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_{50k}またはPEG_{10k})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 (PEG₆₂またはPEG₃₃)は、リシンのアミノ基と直接反応する。

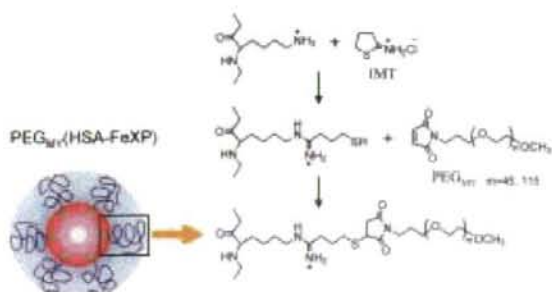


Fig. 1. Two-step reaction schemes of IMT and maleimide-PEG (PEG_n) with HSA-Fe4P.

PEG_n(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_n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_n(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¹¹⁾、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¹²⁾。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)) 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_n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_n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_n(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_{MS-6}(HSA-Fe4P)と略記する。

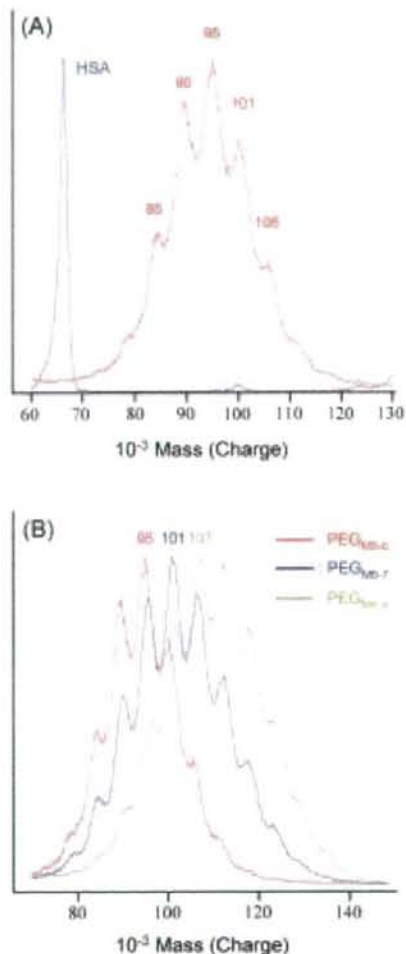


Fig. 2. MALDI-TOF MS of (A) HSA and PEG_{MS-6}(HSA-Fe4P) and (B) PEG_{MS}(HSA-Fe4P) prepared in different [IMT]/[HSA-Fe4P] ratios of 15 (red), 20 (blue) and 30 (green) (mol/mol).

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 _{M3}	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_M on the protein surface.

HSA-Fe4Pに対するPEG_{M3}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_{M3}(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. 2B)。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_{M3}修飾体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)。

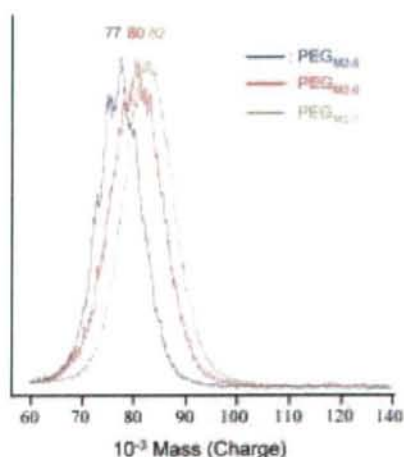


Fig. 3. MALDI-TOF MS of PEG_{M2}(HSA-Fe4P) prepared in different [IMT]/[HSA-Fe4P] ratios of 10 (blue), 15 (red) and 20 (green) (mol/mol).

スクシンイミドPEGで修飾したPEG_{M3}(HSA-Fe4P)のMALDI-TOF MSも、PEG_{M2}(HSA-Fe4P)と同様なピークパ

ターンを示した。PEG₅(5 kDa)の仕込み比を増やすと([PEG₅]/[HSA-Fe4P] = 10, 20, 30 (mol/mol)), 蛋白質当りのPEG₅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、PEG₅(2 kDa)の場合、仕込み量([PEG₅]/[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_{5/4}(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), PEG₅(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_{M3}(HSA-FeXP), PEG₅(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 (すり速度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、生理的條件より幾分高い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すり応力の保全に重要な役割を果た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 _{M2.8} (HSA-Fe3P)	1.01	1.14	26
PEG _{M5.6} (HSA-Fe4P)	1.01	2.34	65
PEG _{S2.8} (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

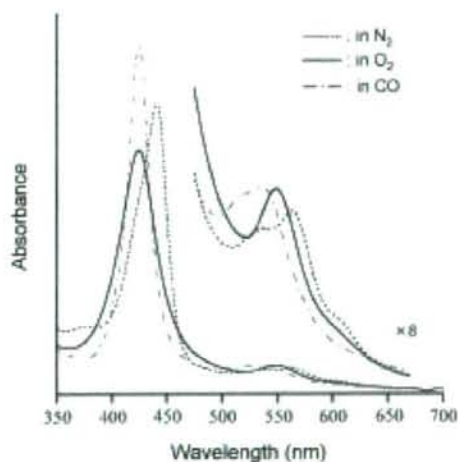


Fig. 4. UV-vis. absorption spectral change of PEG_{M2.6}(HSA-Fe4P) in PBS solution (pH 7.4).

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と相当するが、スペクトルパターンや λ_{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 (λ_{max} : 424, 550 nm) (10b,c,20). 酸素結合解離は酸素分圧に反応して可逆的に生じた。また、一酸化炭素を通気すると、PEG_{M2.6}(HSA-FeP) は安定な一酸化炭素錯体を形成した (λ_{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_{M5.6}(HSA-FeXP) および PEG_{S5.6}(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_{M5.6}(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_{S5.6}(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} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)		k_{off} (ms ⁻¹)		P_{50} ^a (Torr)	$\tau_{1/2}$ (h) at 37°C
	fast	slow	fast	slow		
PEG ₄₂₋₅ (HSA-Fe4P)	11	5.8	0.16	0.08	11(38)	13
PEG ₄₂₋₆ (HSA-Fe4P)	12	4.6	0.17	0.07	11(32)	12
PEG ₄₂₋₇ (HSA-Fe4P)	9.3	4.7	0.16	0.08	13(35)	12
PEG ₄₂₋₅ (HSA-Fe3P)	15	4.2	0.52	0.14	26(41)	8
PEG ₄₅₋₆ (HSA-Fe4P)	12	6.2	0.17	0.09	11(31)	16
PEG ₅₂₋₄ (HSA-Fe4P)	10	4.3	0.14	0.06	11(36)	13
PEG ₅₅₋₆ (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_{50} (Torr) at 37°C.

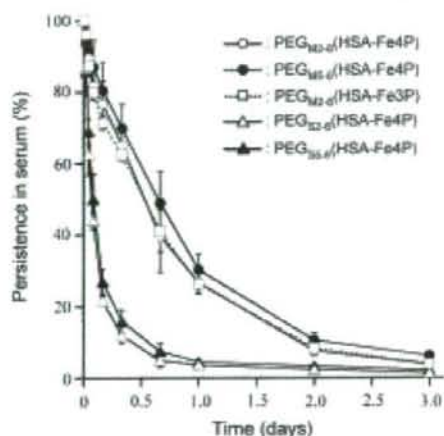


Fig. 5 Persistence of FeXP in serum after administration of PEG conjugated HSA-FeXP into Wistar rats. All values are mean \pm S.D. (n=4).

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、PEG₄₂₋₅(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PEG₄₂₋₅(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²¹。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。PEG₄₂₋₅(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、不可逆酸化を抑制するため、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PEG₄₂₋₅(HSA-FeXP)の半減期はPEG₅₅(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、PEG₄₂₋₅(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、PEG₄₂₋₅(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

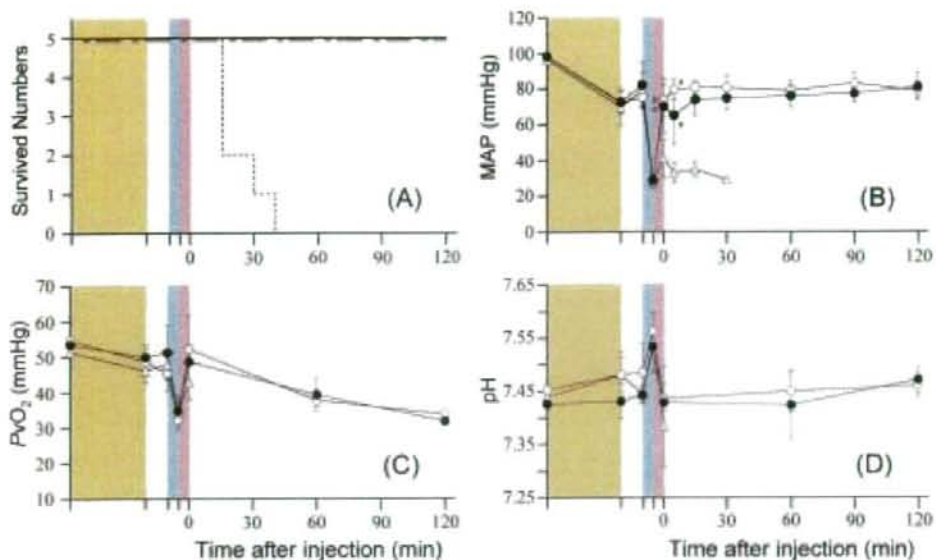


Fig. 6. Effect of PEG₃₂₄(HSA-Fe4P) solution in anesthetized rats subjected to hemodilution and hemorrhage. (A) the changes of their survived numbers, (B) MAP, (C) P_vO₂, and (D) pH. In (A), solid line: PEG₃₂₄(HSA-Fe4P) group, broken and dotted line: RBC group, and dotted line: HSA group. In (B), (C), (D), each value represents the mean \pm S.D. of 5 rats (●, PEG₃₂₄(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す。

謝辞

本研究は、ニプロ(株)および厚労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。

参考文献

- (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.
- Veronese FM. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* 2001;22:405-417.
- Nucci ML, Shorr R, Abuchowski A. The therapeutic value

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

- Kawahara NY, Ohno H. Induced thermostability of poly (ethylene oxide)-modified hemoglobin in glycols. *Bioconjugate Chem* 1997;8:643-648.
- 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.
- Talarico TL, Guise KJ, Stacey CJ. Chemical characterization of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate. *Biochim Biophys Acta* 2000;1476:53-65.
- Vandegriff KM, Malavalli A, Wooldbridge J, Lohman J, Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509-516.
- 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 heme. *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. Dumas 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, Rohlfis R, 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.

救急医療の現場での輸血医療の実態と人工酸素運搬体への期待*

高折 益彦** 堀之内宏久*** 小林 紘一****

■要旨：わが国の186救急医療施設を対象としてアンケートを送付し、緊急輸血の実態、および人工酸素運搬体の開発に関する見解を調査した。そのうち74施設から回答が得られ、緊急輸血症例の51.5%の輸血量が1000ml以内であることが明らかになった。また人工酸素運搬体の酸素運搬機能が24時間は必要であることも明らかになり、現在開発途上にある人工赤血球で要望の77.1%に対応できることも認められた。さらに人工赤血球は検査なくだちに使用できる、血液型の取り違え、感染症などの事故がないことへの期待が大きいことが明らかになった。

■key words：人工赤血球、人工酸素運搬体、輸血代替、救急医療、安全性

はじめに

すでに前世紀初頭から人工酸素運搬体の開発は進められてきていた。しかしようやくこの数年前から臨床使用に耐え得るような人工酸素運搬体の出現をみるに至った。そして海外で2～3の臨床試験が行われた¹⁾²⁾。一方、わが国においてはリボソーム小胞体内にヒトヘモグロビン(Hb)を包埋した人工酸素運搬体を中心に開発が進められてきている³⁾。そしてこの製品に関しての前臨床試験はほぼ完成の域に達している。しかしこの製品の臨床使用には今後段階的に試験を施行しなければならない。したがって実際の臨床に至るまでにはなお時間を要すると思われる。またその間に製品の改良に努め、さらなる優れた製剤を作製することが期待されている。

人工酸素運搬体の臨床使用は多岐にわたると思われるが、その一つに救急医療での輸血への応用がある。すなわち搬送されてきた大量出血を伴う患者の

治療、あるいは医療機関外での出血患者の治療などが該当する。この点をふまえ、今回救急医療に携わる医師を対象に人工酸素運搬体に対する意識調査をアンケート方式にて行った。すなわち、まず現在の救急医療の現場での血液製剤、とりわけ赤血球製剤の使用状況を調査し、将来もし人工酸素運搬体(人工赤血球)が臨床使用可能となったときにはどの程度の利用度があるか、どのような製品が必要とされるかなどの諸点について調査を行った。

I 方法

図1に示す質問事項を記載したアンケート用紙を日本救急医学会の各評議員、195名の方を対象に2005年2月に郵送した。しかし種々の理由から返送されてきたものが9通あり、186通が送付されたものと思われた。このうち、指定期限である3月末日までに回答のあったものは74通(39.8%)で、この回答についてのみ解析を行った。設問には複数回答を要求するものもあったが、あらかじめ単一回答を期待したにもかかわらず複数の回答があったものについては同意義的な項目に編入、あるいはそれぞれ該当する項目に分割する処置などを行い集計した。また設問に対して回答の記入がなかったものは無回答、0とした。そのためそれぞれの設問に対する回答総数が上記74に達しない場合が生じた。複数回答となる設問では当然回答総数が74を超えた。

II 結果

設問1.の輸血を必要とする症例の発生頻度は、毎日3例以上とする回答が12施設、週に3～6例

* Survey of transfusion medicine and perception of artificial oxygen carrier in acute medicine

** 東宝塚さとう病院 *** 慶應義塾大学医学部呼吸器外科

**** 厚生労働省科学研究班医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス研究事業「人工赤血球の安全性向上に関する研究班」主任研究者

Masuhiko Takaori, Hirohisa Horinouchi and Koichi Kobayashi

1. 現在先生の診療なさっている部署で輸血が必要となる症例の頻度はどれぐらいでしょうか。
A) 毎日3例以上 B) 週に3から6例 C) 月に3から6例 D) 月3例以下
E) ほとんどない
 2. 輸血を行う症例の輸血量は症例によりさまざまと思われませんが、頻度が高いのは以下のどのレンジでしょうか。
A) 400ml~1000ml B) 1000ml~2000ml C) 2000ml~3000ml D) 3000ml以上
 3. 輸血を使用する際、使用を決断してから輸血が開始されるまでどの程度の時間を要していますか。
A) 5分以内 B) 15分以内 D) 30分以内 E) 30分以上
 4. 夜間に血液を使用するとき血液が使用できるまでの時間は日勤帯と比べていかがでしょうか？
A) 日勤帯とほとんど変わらない B) 日勤帯と比較すると夜間帯では時間がかかる
C) 夜間帯のほうがスムーズに輸血が可能である
 5. 救急の現場で、輸血を行う場合、Informed consentが必要となります。先生の施設ではICをどのようにとっていらっしゃいますか。
A) 緊急の場合は説明なしで輸血を行っている
B) ICなしで輸血は行わない。
 i) ICは本人から取る
 ii) ICは患者家族から取る
 iii) 患者あるいは家族、関係者まで含め、いずれかよりICを取る
 6. 大量輸血が必要な症例で注意しておられる事項がございましたら下記から選択してください(いくつでも可)。
A) 膠質輸液も使用する
B) 凝固能をチェックしている
C) 電解質(Caも含め)をチェックしている
D) 循環系諸標をモニターする(Thermodilution catheterなど)
E) 溶血、肝機能、鉄代謝についてモニターしている(ハプトグロビン、トランスフェリンなども含め)
F) その他()
 7. 輸血に伴う感染症について輸血後のモニターはどのようにされておられますか。
A) HbV, HCV, HIVについては輸血後6から8週後に検査を行っている
B) 患者からの申し出があったときに検査を行っている
C) 他の診療科に依頼している
 8. 輸血に伴う不規則抗体の発現について輸血後モニターされておられますか。
A) している B) していない
- ここで人工血液についてお伺いいたします。
9. 人工血液について知っていますか。
A) 医学雑誌の記事あるいは論文を読んだことがある
B) 新聞報道などで開発が進んでいることは知っている
C) 知らない

図1a アンケート用紙

10. 人工赤血球が臨床使用できるようになれば、使用したいと思われませんか。
A) 使用したい B) 使用しない C) 有効性が輸血よりも優れていれば使用する
11. 人工赤血球にもっとも必要な資質は酸素運搬能と思いますがそれ以外に必要なものは何だ
とお考えでしょうか。
A) 血液と同等の粘度を保有すること B) 循環血液量を保持する能力
C) その他 ()
12. 人工赤血球の使用上限が規定されるとすれば、上限量がどの程度であればよいとお考えで
すか。次の中から選びください。
A) 100ml まで B) 250ml まで C) 500ml まで D) 1000ml 以上
13. 人工赤血球は血液型がなく、常温で保存可能となるよう設計されています。このため、輸
血が必要な症例には投与を決断すれば直ちに投与が可能です。
先生が治療される輸血を必要とする患者さんの中で緊急輸血の判断を迫られる症例の頻度
はどれぐらいでしょうか。
A) 毎日1症例はある B) 週に1～数症例 C) 月に1～数症例
D) すべての患者で診療の初期段階は輸液で対応するので、血液が直ちに必要となる症例
はない
14. 輸血治療が緊急に必要な患者でICが取れない場合、投与可能な人工血液があればICが取
れるまでのつなぎとして人工赤血球を使用されますか。
A) 人工赤血球を使用する B) ICが取れるまで晶質液中心の輸液で対応する
C) その他
15. 外傷による出血の症例では現場からの治療が救命に大きな役割を果たすことが明らかと
なっています。救急現場での治療が可能となるとしたら、次のいずれのレベルまでが行わ
れるべきと考えますか。
A) 呼吸管理のみ (気管内挿管を含む)
B) A)+生食による輸液管理
C) A)+B)+ 膠質輸液も含めた循環管理
D) A)+B)+C)+人工血液の投与も含めた循環管理
16. 人工赤血球は有効半減期が短いことが予想されています。臨床使用する際、有効半減期と
してどの程度の時間が必要とお考えでしょうか。
A) 2時間 B) 12時間 C) 24時間 D) 48時間以上
17. 厚生労働省科学研究班の研究では人工赤血球は投与後脾臓や肝臓のマクロファージに補足
され、代謝は細網内皮系で行われ、14日後には血液生化学、組織学的な変化を残さないこ
とが報告されています。またその間一時的な食欲低下とその後の活性化が明らかとな
っています。ヒトでも同様の代謝経路が予想されています。外傷患者に対して投与した
場合も細網内皮系の一時的な低下とその後の活性化が予想されますが、このことは治療
の上で問題となるとお考えでしょうか？
A) 問題であると思われる 理由 ()
B) 問題とはならないと思う
18. 最後に人工赤血球に期待する要素について先生のお考えがございましたらお教えください。
()

図1b アンケート用紙

が42施設 (58.3%)であった。また各月3~6例は11施設、3例以下は7施設であった。

設問2.での使用輸血量の分布については、400~1000mlが34施設、1000~2000mlが32施設、2000~3000mlでは7施設であり、3000ml以上の回答はなかった。すなわち全体の90.4%が400~2000mlの輸血量の範囲であったが、さらにその51.5%は400~1000mlの範囲にあった。

設問3.にあった輸血する決断から実際の輸血開始までの時間は、5分以内が3施設、15分以内が16施設、30分以内では29施設であったが、30分以上とするものも23施設あった。すなわち15分以内とする回答は全体の26.7%で、15分以上が73.2%となっていた。

設問4.の救急部から該部門への輸血血液供給依頼から実際の使用まで所要時間について、日勤帯と夜勤帯とに差がないと回答したのは37施設であった。夜勤帯で長くなると回答したのは32施設であったが、逆に日勤帯より夜勤帯のほうが迅速に施行できるとの回答が2施設よりあった。

設問5.のinformed consent受領の仕方、informed consentなしで輸血を施行すると回答した施設が25施設、必ずinformed consentを行って輸血を施行する施設が43施設であった。さらに原則的に患者本人からinformed consentを取ると回答したのは4施設であり、informed consentを家族も含めて取るのは4施設、本人、家族ならびにその他いずれかからとするのは36施設であった。

設問6.の大量輸血での処置および検査項目に関するアンケートでは、膠質液の使用、凝固能の検査、電解質の検査、循環系のモニターを併せて行っているとする施設が15施設、溶血、肝機能、鉄代謝のチェックも含めてすべての検査を行うとする施設が8施設あった。しかし膠質液を使用し、凝固能検査、電解質の検査の3項目を行うとする施設は12施設あり、その他の項目との組み合わせを含めこの3項目は49施設、67.1%で行われていた。

設問7.における輸血後感染症に関する検査は救急部、および他診療科で43施設、63.2%において施行され、患者からの依頼があったときのみ施行する施設は25施設であった。

設問8.の輸血後の不規則抗体の発現に関して、検査しているとする27施設に対して、検査していない施設は44施設 (61.9%)であった。

今後臨床に導入されるであろう人工赤血球に関する設問9.で、すでに論文などにて人工赤血球につ

いてなんらかの見識を持っているとの回答は58名 (80.5%)であったが、まったく情報を得ていないとする回答14名 (19.4%)も認められた。

設問10.に対しては条件しだいでは人工赤血球を使用したいとする回答を含め、使用したいとする回答は20名 (25%)であったのに対し、不確定要因を含めて使用しないとする回答が60名 (75%)であった。

設問11.の酸素運搬能以外に人工赤血球に必要な条件として循環血液量維持とする回答は60名 (78.9%)、血液粘度の維持は13名 (16.6%)の回答があったが、それ以外に止血機能を妨げない、生体内ラジカルの消去、赤血球同様の変形能、浸透圧の維持、即使用される利便性などがあつた。

設問12.での人工赤血球の予想使用量上限に関しては100mlまでとする回答はなく、250mlが3名 (4.3%)、500mlが20名 (28.9%)で、1000ml以上の使用とする回答は46名 (66.6%)であった。

もし人工赤血球の臨床使用が可能となっていた場合に緊急輸血に対してどれくらいの頻度で使用される可能性があるかとの設問13.に対して、初期段階では輸液にて対応するので該当症例はないとする回答は5施設 (7.1%)、毎日使用する症例があるとする回答が4施設、1~6症例/週が27施設、1~6症例/月が34施設であった。すなわち毎月使用する可能性があるとする回答は65施設 (92.8%)で、さらに毎週使用する可能性のある施設も31施設 (44.2%)あった。

設問14.で赤血球製剤使用に関するinformed consentが受領できるまでの人工赤血球の使用に関しては、informed consent受領と関係なく使用するとの回答が57名 (79.1%)、晶質液中心にて、あるいはその他の方法にて対応するが15名 (20.8%)であった。

病院外での救急救命処置としての設問15.では、呼吸管理のみが6名、呼吸管理と体液管理 (晶質液単独、膠質液との併用) が33名、さらにこれらに人工赤血球を併用した管理が33名であり、人工赤血球使用を併用可と回答したのは全体の45.8%に相当していた。

設問16.での人工赤血球の有効半減期に対して、2時間は必要との項目を選択したのは10名、12時間が28名 (40.0%)、24時間が26名 (37.1%)、さらに長時間を必要とする回答は6名であった。

設問17.での人工赤血球の網内系への影響については、治療上問題とならないとする回答が29名

(42.0%)であったのに対して、問題となると考えるのは40名(58.0%)であった。とくに易感染性を懸念する見解が25名(36%)にみられた。しかし一方、逆に生体からのメディアータの遊離を少なくして反応を緩和する可能性があるとする意見が2名(3%)に、感染以上に出血死の回避が先決とする意見が3名(4%)にみられた。

設問18.での人工赤血球への期待には33名から回答が得られたが、膠質・晶質液にはない酸素運搬液であること9名(27.2%)、必要時での即応性について言及した意見8名(24.2%)、輸血に伴う副作用・合併症の回避を挙げた意見4名(5.7%)などが主なものであった。

Ⅲ 考 察

アンケートの回収率が39.8%とやや低率であったが、今回の調査で目的とした要点は得られたものと思われた。今回の調査に協力いただいた日本救急医学会評議員の方の多く(80.5%)はすでに人工赤血球に関してなんらかの見識を持っておられた。そしてもし人工赤血球が臨床使用可能となった場合には毎週でも使用する可能性のある施設は31(44.2%)であることは現在の人工赤血球の有効性(有効作用時間)、副作用の認容(網内系への影響)に関する回答率とも一致している。また使用輸血量は400~1000mlとする施設が51.5%となっていたが、このことは最近の日本血液代替物学会が提案した“人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項(案)”に対して解説した論文²⁾で人工赤血球の使用量を一応、20ml/kgと唱えていることとも一致する。すなわち現在開発が進められている人工赤血球で救急患者の半数の輸血に対処できることを示している。一方、人工赤血球使用量への希望は1000ml以上とする回答が全体の66.6%を占めているので、これは今後の人工赤血球開発に対する課題であり、さらなる改良が必要と思われる。

人工赤血球に期待された事項中、もっとも多かったのは確実な酸素運搬能、そして組織への酸素供給であった。またこのような人工赤血球の循環血液内での有効時間については12時間とするものを含め、24時間とする回答が半数を占めているが、現在開発中の人工赤血球の投与後循環血液中滞留半減時間は約30時間⁸⁾と推定されるので、まず多くの現場からの要望に応えられると思われる。しかし人工赤血球内に包埋されているヘモグロビンのメトヘモグロビンへの変化の半減時間に関してはいまだヒトでの

データがなく、ラットでの研究では16~18時間⁹⁾となっている。ラットでのデータがそのままヒト、すなわち臨床例には適応されないので、今後の臨床研究で検討しなければならない事項である。

人工赤血球が必要時にただちに使用できることにはとくに大きな期待がある。現行の輸血医療では患者、あるいはその関係者からの輸血施行の informed consent を得るのに時間を要し、さらに輸血発注から実際の輸血までに15分以上の時間を要することが今回の調査で示されている。これに反し現在わが国で開発が進められている人工赤血球は、室温での保存で少なくとも2年間の品質安定性が確認されている⁶⁾。このことは人工赤血球は一般治療薬として用いることができることを示しており、救急部の薬品棚、あるいは救急車の中にも常備することが可能であり、よりよい救命効果が得られると期待される。

さらに人工赤血球への期待には輸血に伴う副作用、合併症を回避したいとの願いが含まれていることも認められた。人工赤血球には血液型がなく、いわゆる universal blood である。したがって血液型の取り違えに伴う輸血事故の発生、あるいは遅発性溶血反応などの免疫性輸血合併症を防止できる。さらに一般輸血に伴う不規則抗体の発生が回避できる。一般輸血でのその発生率は3.1~36.4%¹⁰⁻¹²⁾に及ぶと報告されていて、少なくとも5~10%は生じるのではないかと推測されている。輸血が繰り返される場合での合併症を考えると、この数値は軽視できない。ただ今回の調査では輸血後不規則抗体発生に関する一般的な関心は少ないように思えた。

人工赤血球の製造過程においてはウイルス、細菌などの病原体の不活性化も加えられている。そのため輸血性感染症の回避は確実で、この点に関しても人工赤血球への期待が今回の調査に認められた。

現在開発中の人工赤血球はヒトのヘモグロビンをリポソームの二重膜内に包埋したものであるが、これを生体の循環血液中に投与した際には異物と認識され生体の網内系で捕捉される。したがって投与後一時的に生体の網内系の機能が低下し、その後はむしろ亢進する⁷⁾。この点に関してなんらかの危惧を抱く意見もみられる。しかし生体の抵抗力への危惧よりも出血に伴う生命の危機からの脱出を優先すべきであるとの意見もあり、むしろ蘇生を目的とした人工赤血球としての意義が重要視されるべきではないかと思われる。

現在開発中の人工赤血球、すなわちリポソーム包

埋ヘモグロビンを生理食塩液に浮遊させた製品では膠質浸透圧がなく、投与後の血液量維持効果に欠ける。それゆえに使用量の上限が定められている。日本血液代替物学会が提案した“人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項(案)”に対する解説論文⁹⁾でも20ml/kg以上の量を使用する際にはなんらかの膠質液の併用を推奨している。ヘモグロビン包埋リポソーム粒子を膠質液に浮遊させた製品を作製する考えもあるが、臨床の現場では人工赤血球、すなわちヘモグロビン包埋リポソーム粒子投与量と膠質液投与量との比率は各症例ごとに異なる可能性があり、むしろこのように生理食塩液に浮遊させた人工赤血球と膠質液とは別個に投与することの方が現実的ではないかと思われる。

まとめ

今回、日本救急医学会の評議員を対象として救急医療現場での輸血医療の現状と将来開発される人工赤血球への期待についても調査を行った。その結果、現在、救急部での患者管理上、必要とする輸血用血液の少なくとも50%を開発中の人工赤血球で代替できることが認められた。またさらに投与後の酸素運搬機能維持時間についても半数の施設からの期待を満足させることも認められた。そして人工赤血球が速やかに臨床使用されることへの期待が大きいこと、とくにその保存が容易なこと、universal bloodとして使用できること、副作用・合併症の回避ができることへの期待が認められた。

謝辞：この調査にご協力いただいた日本救急医学会の各評議員の方々に心からの謝意を呈する。またこの調査は厚生労働省科学研究(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「人工赤血球の安全性向上に関する研究」研究事業の補助研究費の支援により行われた。

【文 献】

- 1) Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, et al: Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: A randomized controlled efficacy trial. *JAMA* 282: 1857-1864, 1999.
- 2) Spahn DR, van Brempel R, Theilmeier G, et al: Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. *Anesthesiology* 91: 1195-1208, 1999.
- 3) Gawryl MS: Hemopure: Clinical development and experience. *人工血液* 11: 46, 2003.
- 4) Kobayashi K, Horinouchi H, Watanabe M, et al: Safety and efficacy of hemoglobin-vesicles and albumin-hemes. In: Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, ed. *Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line*. Springer, Tokyo, 2005, pp 1-21.
- 5) 高折益彦: “人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項”を解説する. *人工血液* 13: 104-111, 2005.
- 6) 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.
- 7) Tsutsui Y, Kimura T, Ishizuka T, et al: Duration of efficacy NRC (Neo Red Cell) in a rat hemodilution model. *人工血液* 10: 36-41, 2002.
- 8) 宗慶太郎, Klipper R, Goins B: ヘモグロビン小胞体の体内動態解析. *人工血液* 12: 53, 2004.
- 9) Cox JV, Steane E, Cummingham G, et al: Risk of alloimmunization and delays hemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. *Arch intern Med* 148: 2485-2489, 1988.
- 10) Fluit CRMG, Kunst VAJM, Drenthe-Schonk AM: Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. *Transfusion* 30: 532-535, 1990.
- 11) Redman M, Regan F, Contrera M: A prospective study of the incidence of red cell allo-immunisation following transfusion. *Vox Sang* 71: 216-220, 1996.

[原稿受理日 2006年9月27日・受領No. 2221]



Effect of hemoglobin vesicle, a cellular-type artificial oxygen carrier, on middle cerebral artery occlusion- and arachidonic acid-induced stroke models in rats

Hirotosugu Komatsu^{a,*}, Toshiyuki Furuya^a, Natsue Sato^a, Katsuji Ohta^a, Akihiro Matsuura^b, Takao Ohmura^b, Satoshi Takagi^b, Masaki Matsuura^c, Mitsuru Yamashita^c, Makiko Itoda^c, Jiro Itoh^c, Hirohisa Horinouchi^d, Koichi Kobayashi^d

^a *Yokohama Research Center, Oxygenix Co. Ltd., Leading Venture Plaza 2-401, 75-1, Ono-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0046, Japan*

^b *Oxygenix Co. Ltd., Toranomon Pastoral Main Tower 6F, 4-1-1, Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105-0001, Japan*

^c *Gifu Institute, Japan Biological Science Co. Fukue 52, Kaizu-cho, Kaizu 503-0628, Japan*

^d *Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, Shinanomachi 35, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan*

Received 23 March 2007; received in revised form 20 April 2007; accepted 20 April 2007

Abstract

Hemoglobin vesicle (HbV), which is also called liposome-encapsulated hemoglobin, functions as a hemoglobin-based oxygen carrier and is expected to be utilized in emergency situations including hemorrhagic shock and several kinds of ischemic diseases. In the present study, we evaluated the efficacy of HbV for improving stroke-related symptoms induced by middle cerebral artery (MCA) occlusion/reperfusion and an intra-internal carotid arterial injection of arachidonic acid (AA) in rats. When HbV (10 mL/kg, i.v.) was administered to rats immediately after the MCA occlusion, it reduced the cerebral infarct volumes of the cortex and total of the cortex plus sub-cortex significantly as compared with saline as a vehicle. In AA-induced stroke model, HbV (10 mL/kg, i.v.) improved the motor dysfunction score and inhibited the increase in cerebral water content suggesting it could suppress cerebral edema. These results strongly suggest that HbV would provide a novel beneficial option for the treatment of stroke, especially acute ischemic stroke.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Hemoglobin vesicle; Oxygen carrier; Red blood cell substitute; Artificial; Liposome; Stroke

Hemoglobin vesicle (HbV) is a cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier encapsulated by liposome. Since HbV has been already demonstrated to deliver oxygen to organs in the same manner as normal red blood cells (RBCs), it is expected to play an important role as RBC substitute (artificial RBC). Its long stability at room temperature and compatibility to all blood types make it specifically attractive for use in emergency situations. Main characteristics of the HbV that we employed in the present study are as follows [21,13,22]: median particle diameter, 262–269 nm; Hb concentration, 10.0–10.6 g/dL; p50, 23–25 Torr; lipid concentration, 6.9–7.2 g/dL; lipid components, 1, 2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylecholine (DPPC)/cho-

lesterol/1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamine (DHSG)/1, 2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-polyethylene glycol 5000 (PEG5000-DSPE). The biological activity of HbV has been previously studied in several kinds of animal models. For instance, Izumi et al. demonstrated in a rat exchange-transfusion model that HbV has an oxygen transporting capability almost equivalent to rat RBCs and can be considered as a potential artificial oxygen carrier [12]. As another potential advantage, HbV has been projected to improve ischemia-related symptoms since it can penetrate into ischemic areas through incompletely occluded arteries, arterioles and/or collateral vessels because the particle size is much smaller than that of normal RBC. In fact, HbV improved oxygenation in acutely ischemic hamster flap tissue [8] and augmented oxygen delivery through transiently occluded arterioles in a hamster window model [17]. However, the effects of HbV in stroke and myocardial infarction models, which are typical ischemic

* Corresponding author. Tel.: +81 45 521 1785; fax: +81 45 521 1786.

E-mail address: komatsu@oxy-genix.com (H. Komatsu).

URL: www.oxy-genix.com (H. Komatsu).

models, have not been fully investigated. In the present study, we evaluated the effect of HbV on stroke episodes using a transient middle cerebral artery (MCA) occlusion model and an arachidonic acid (AA)-induced stroke model in rats.

All animal study protocols were confirmed to be in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the institutional animal care and use committee of Oxygenix Co. Ltd.

In the study of MCA occlusion/reperfusion [4,27], 63 male Wistar rats (Japan SLC, Shizuoka, Japan) weighing 209–245 g (9 weeks of age) were included. Under halothane anesthesia (2–3%, 0.5–1 L/min), rats underwent transient focal cerebral ischemia using an intraluminal suture. Body temperature was controlled at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ with a body temperature controller (Neuroscience, Tokyo, Japan). The right carotid artery bifurcation was exposed, and the common external and internal carotid arteries were mildly ligated transiently. The external carotid artery was incised at the 2-mm distal from the junction of internal carotid artery and a 4–0 monofilament suture (18 mm in length) coated beforehand by silicon was inserted via this incision and advanced through the internal carotid artery to the origin of the MCA. The suture was left in place for 1 h and then pulled out

about 10 mm to allow reperfusion. HbV (10 mL/kg) or saline was intravenously administered immediately after the MCA occlusion at an injection speed of 2 mL/min. Twenty-three hours after the reperfusion, the neurological symptom score was determined by the following criteria: 0, no symptoms; 1, adduction of left forelimb; 2, adduction of left forelimb and decrease in response to transversal stimulus; 3, adduction of left forelimb, decrease in response to transversal stimulus, and circling movement; 4, unable to walk (abasia). Immediately after the evaluation of neurological symptoms, rats were sacrificed to excise their brains, which were then sliced into 7 sections (2-mm thick) and stained with 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Tokyo, Japan) at 37°C for 30 min with shaking, then immersed in 10% formaldehyde neutral buffer solution (Wako Pure Chemical Ind. Ltd.) for preservation. Photograph of each section was taken with a digital camera (Fujifilm, Tokyo, Japan) and the infarct area was measured with a personal computer (iBook, Apple) and software (Adobe Photoshop® ver. 5.5 and NIH image ver. 1.62). Infarct volume was calculated from the data of infarct area according to the following formula: infarct volume = $A + G + 2 \times (B + C + D + E + F)$, where A–G refer to the areas of 7 sections. The infarct volume was

Table 1
Criteria of motor dysfunction score

1. Rolling test

Score	Symptom
0	Rat does not fall down and run away without resistance and/or turn its face to opposite direction in response to pushing right and left flanks.
1	Rat makes resistance or move to left side in response to pushing right flank.
2	Rat does not fall down in response to pushing left flank and do roll in a clockwise direction in response to pushing right flank.
3	Rat falls down stretching hind limbs out sideways but not forelimbs in response to pushing left flank.
4	Rat falls down stretching four limbs out sideways in response to pushing left flank and rise in 4 s.
5	Rat falls down stretching four limbs out sideways in response to pushing left flank and rise in 5–29 s.
6	Rat falls down stretching four limbs out sideways in response to pushing left flank and cannot rise for 30 s or longer.
7	Rat falls down rightward without stimulus and can not rise for 30 s or longer.

2. Posture test (when neck of rat was picked up)

Part	Score	Symptom
Head	0	Rat does not lean its head to the right or left and keep its eyes horizontally.
	1	Rat leans its head to the right but keep its eyes horizontally.
	2	Rat leans its head to the right and turns slightly its right eyes downward.
	3	Rat leans its head to the right and turns markedly its right eyes downward.
Right forelimb	0	Rat does not put down its right forelimb.
	1	Rat slightly puts down its right forelimb.
	2	Rat puts down its right forelimb but does not place it on the abdomen.
	3	Rat remarkably put down its right forelimb and place it on the abdomen.
Right hind limb	0	Rat does not put down its right hind limb.
	1	Rat slightly puts down its right hind limb.
	2	Rat remarkably put down its right hind limb but keeps its adduction slightly.
	3	Rat remains down the tip of its right hind limb just underneath.

3. Hemiplegia test

Score	Symptom
0	Rat makes a strong resistance and pulls back its right hind limb immediately when it is lifted with a pen.
1	Rat makes a slight resistance and pulls back its right hind limb slowly when it is lifted with a pen.
2	Rat remains its right hind limb stretched without resistance when the limb is stretched backward.

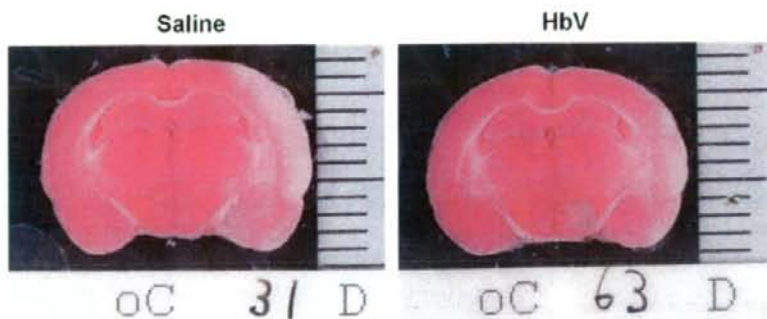


Fig. 1. Representative photographs of TTC-stained cerebral sections taken from MCA-occlusion/reperfusion-induced stroke rats. Left and right panels are photographs of saline- and HbV-treated rats, respectively. The individual rats shown here approximate mean values for the infarct volume in each group (infarct volumes of left and right panels were 194.1 and 119.0 mm³, respectively; the mean values of saline- and HbV-treated groups were 174.8 and 114.1 mm³, respectively).

determined separately in the cortex, sub-cortex, and the total of cortex plus sub-cortex.

For the experiment of AA-induced stroke model [23], 42 male Wistar rats (Japan SLC) weighing 223–248 g (9 weeks of age) were used. Under halothane anesthesia, rats underwent the cervical median incision. A polyethylene cannula was inserted into the left external carotid artery and advanced through it to the origin of the internal carotid artery. AA (2 mg/kg, Sigma–Aldrich, Japan) was injected through the cannula at an injection speed of 0.4 mL/min. HbV (10 mL/kg) or saline was intravenously administered immediately after the injection of AA. Survival of rats was confirmed 3 h after the AA injection, and surviving rats were subjected to a motor dysfunction test in accordance with the criteria shown in Table 1 (maximal total score: 18). The score of a deceased rat was counted to be 19. Then, each rat was sacrificed by decapitation to obtain the whole brain. Cerebellum, medulla oblongata, ponticulus, and bulbus olfactorius were removed from the whole brain, and the remaining organ (cerebrum) was divided into right and left hemispheres along the corpus callosum. After both the hemispheres were measured for wet weight (*W*), they were dried in an oven heated at 80 °C for 3 days or longer and weighed again to obtain the dry weight (*D*). The cerebral water content was calculated as follows: cerebral water content (%) = $(W - D)/W \times 100$.

Data are indicated as the mean \pm standard error. Statistical significance was determined with Excel 2003 or 2004 (Microsoft), SAS System (ver.8.2, SAS Institute, Tokyo, Japan), and EXSAS (ver.7.14, Scientist, Tokyo, Japan). Differences in the neurological symptom and the motor dysfunction score were tested by the Aspin–Welch *t*-test. Differences in infarct size and cerebral water content were tested by the *F*-test followed by either the Student's *t*-test or the Aspin–Welch *t*-test, when the variances of both groups were similar or dissimilar, respectively. Difference in survival rates was analyzed by the Chi-square test. These differences were regarded as statistically significant when *p*-values were less than 0.05.

In the MCA-occlusion/reperfusion-induced stroke model, neurological symptom scores (mean \pm S.E.M.) of the saline- and HbV-treated groups were 2.3 ± 0.2 and 1.9 ± 0.1 , respectively. The difference between the groups was not statistically significant

although HbV showed a tendency to decrease the score. Fig. 1 shows representative photographs of TTC-stained cerebral sections derived from MCA-occlusion/reperfusion-induced stroke rats. The left panel (saline-treated rat) shows that about half of the area (infarct area) of the right hemisphere did not stain with TTC. On the other hand, an area that is not stained with TTC in a HbV-treated rat (right panel) reduced remarkably as compared with that of a saline-treated rat. The infarct volumes of rats corresponding to left and right panels were 194.1 and 119.0 mm³, respectively. These rats shown in the images were selected to represent mean values for infarct volume in each group (saline-treated group, 174.8 mm³; HbV-treated group, 114.1 mm³) as described below. The results of quantitative analysis on the infarct volumes are summarized in Fig. 2. Infarction volumes of the cortex and the cortex plus sub-cortex in HbV-treated rats were significantly smaller than those in saline-treated rats. Infarction volumes of the sub-cortex was also decreased to 81.4% of saline-treated rats by HbV treatment although the difference was not statistically significant ($P = 0.0572$).

In response to the injection of AA into the internal carotid artery, 3 of 19 saline-treated rats (15.8%) died within 3 h (Table 2). On the other hand, all rats treated with HbV sur-

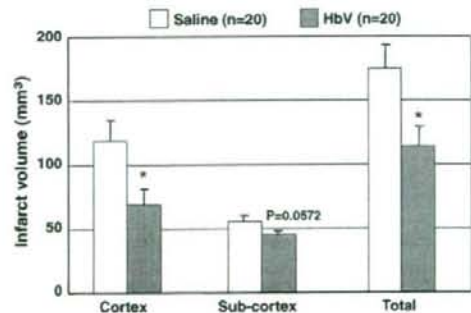


Fig. 2. Effect of HbV on MCA-occlusion/reperfusion-induced cerebral infarction in rats. Columns and bars indicate the mean and standard error of cerebral infarct volume, respectively. * $P < 0.05$, significantly different from the saline group (Student's *t*-test).

Table 2
Survival rate and motor dysfunction score

Test material	Survival rate	Rolling test	Posture test			Hemiplegia test	Total (mean \pm S.E.)
			Head	Right forelimb	Right hind limb		
Saline	16/19 (84.2%)	4.6	2.4	2.7	1.7	12.8 \pm 0.9	
HbV	20/20 (100.0%)	3.5	1.8	2.6	0.9	9.4 \pm 0.7 ^a	

^a $P < 0.01$ vs. saline (Aspin–Welch *t*-test).

vived the injection of AA although the difference in survival rate between saline- and HbV-treated groups was not statistically significant. The motor dysfunction score of the HbV-treated group was significantly lower than that of the saline-treated group. As a result of AA injection, cerebral water content of left hemisphere (AA-injected side) was increased, indicating that cerebral edema was induced, and the administration of HbV significantly inhibited that increase (Fig. 3).

In the present study, HbV has been demonstrated to have protective effects on ischemic brain both in rat MCA-occlusion/reperfusion- and AA-induced models. MCA occlusion/reperfusion model has been well characterized and frequently used to evaluate drug efficacy on cerebral ischemia and infarction [24,26,2,11,1]. Treatment with HbV immediately after MCA occlusion significantly reduced infarct size (34.7% reduction), which is comparable to t-PA in the embolic model with blood clot (34% reduction) [6]. Edaravone, a radical-scavenging neuroprotectant that is in routine use for acute phase stroke in Japan, inhibited cerebral infarction by 20–25% in MCA occlusion models [16,14]. Although different experimental conditions were employed for each of these products, HbV was concluded to be effective in a model of stroke, as compared to well-known anti-stroke drugs.

AA-induced model has been used as an experimental thrombo-embolic stroke model, which is characterized by inducing platelet aggregation, endothelial damage and cerebral edema [23,9], and as a peripheral vascular disease model, e.g. gangrene in rats [25]. In addition to platelet activation and aggregation resulting in the formation of vascular occlusive blood clot, AA induces a rupture of the blood brain barrier and an increase in vascular permeability. In this model, HbV suppressed the increase in cerebral water content, a parameter representing the cerebral edema, of which inhibition was closely related to the improvement of motor dysfunction score seen in the HbV-treated group.

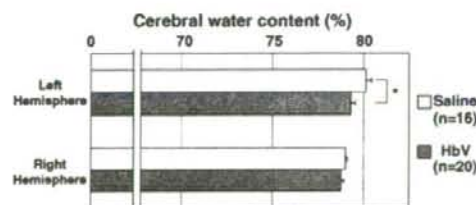


Fig. 3. Effect of HbV on AA-induced cerebral edema in rats. Columns and bars indicate the mean and standard error of cerebral water content, respectively. * $P < 0.05$ (Aspin–Welch *t*-test).

Thus, HbV has been found to be effective in the treatment of stroke as shown in the present experiments, but its mode of protective action has not been fully clarified. Protection of ischemic cerebral tissues by medical and drug interventions is mainly attributable to the oxygen supply to ischemic regions during ischemia, and the increased oxygen supply during ischemia seems to contribute to the inhibition of injury after reperfusion. It is possible that HbV can penetrate into ischemic areas through incompletely occluded arteries, arterioles and/or collateral vessels thanks to its small particle size, consequently deliver oxygen to the area, inhibit cerebral hypoxia, and decrease infarct size. The direct analysis of blood flow and oxygen metabolism/consumption in the ischemic brain after HbV administration remains to be investigated.

Although re-oxygenation is requisite for salvaging ischemic brain tissue, reactive oxygen and/or nitrogen species generated during reperfusion play important roles in further deterioration of ischemic brain. A nonselective nitric oxide (NO)-synthase inhibitor, L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME) is reported to reduce cerebral infarct volume by abolishing the increase in brain NO production in a model of transient focal cerebral ischemic mice [7]. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) ameliorated ischemic cerebral injury in rats by binding NO, which has been implicated as neurotoxic [5]. HBOC-201, glutaraldehyde-polymerized bovine hemoglobin, reduced ischemia-reperfusion injury in canine myocardial ischemia in part by delivering more oxygen to ischemic tissue, and moreover, increased regional perfusion and blood pressure by scavenging NO [10]. These findings suggest that NO scavenging by cell-free hemoglobin is one of the possible mechanisms to mitigate ischemic injury. On the other hand, in the preclinical safety evaluation of DCLHb, myocardial lesions were observed following administration of DCLHb to certain species, and it was suggested that reduction in NO level was an important mechanistic factor for the myocardial lesions [3], indicating that the NO scavenging effect has both faces of advantage and disadvantage. Because the NO scavenging activity is an intrinsic property of hemoglobin, hemoglobin-based oxygen carriers are generally possible to capture NO, diminish NO-induced vasodilation, and cause myocardial lesions. However, it is considered that cell-free hemoglobin such as DCLHb extravasates through endothelial layer due to its small size (less than 50 nm in diameter) and trap NO, on the other hand, HbV, a first cellular-type oxygen carrier, does not extravasate owing to its moderate size (around 260 nm in diameter) [15]. In fact, HbV was generally safe in a single-dose and multiple (14 days-repeated)-dose toxicity studies as demonstrated by Sakai et al. [19,18,20], presuming that it would not induce such myocardial lesions, though more detailed