

る。

感染性心内膜炎は、まれであるが重要な合併症である。感染性心内膜炎の予防は手術既往の有無やそのリスクの高低にかかわらず行う施設と不要とする施設がある。

非手術施行例のPS症では、右室圧負荷と三尖弁閉鎖不全によって主として心房粗動や心房細動などの上室性不整脈が見られることがある。上室性不整脈が見られ始めたときは右室不全の発生または悪化の前徴である可能性がある。弁切開術後の成人でも、特に血行動態上重大な病変が残存している例では、上室性および心室性不整脈が見られることがある。肺動脈弁切開術を外科手術もしくはカテーテル治療によって受けた後には肺動脈弁閉鎖不全(pulmonary regurgitation; PR)による右室拡大、残存PS、肺動脈弁下狭窄、上室性不整脈、心室性不整脈が生じることがあり、突然死の報告も存在する。

若年女性患者の場合の妊娠出産も重要な問題である。無症状の女性は妊娠中の心雑音を指摘されて初めて循環器医に診察を受ける例がある。PSが軽度ないし中等度である場合、また手術か経皮的バルーンカテーテル弁切開術で治療が成功している場合には、妊娠を無事に乗り切ることが可能である。一方、PSが重度の場合では、妊娠がそれ以前の心機能の程度にかかわらず、右心不全や心房性不整脈を悪化させることがある。このような妊娠中女性は出産前に狭窄解除を受けるべきである。経皮的バルーンカテーテル弁切開術は、心不全症状の進行が見られる妊娠女性にも行われることがある。

経過観察の必要性もPSの程度によって変わる。最大圧較差が25mmHg未満の治療歴のない成人患者は循環器医による定期的診察は不要であり、通常的生活レベルを送ることが可能である。一方、最大圧較差が25mmHg以上、または治療(外科手術またはカテーテル治療)歴のあ

る成人患者は、治療または再治療の適応になる可能性があるので生涯の経過観察を要する。狭窄の進行、PRの存在に伴う右心室のサイズや機能、三尖弁閉鎖不全の程度、また心内短絡の存在を中心に経過観察を行う。軽度狭窄例、治療後に右心室・左心室共に血行動態が良好になった例では運動の制限は不要であり、耐久性スポーツや競争、コンタクトスポーツも可能である。中等度狭窄例では血行動態が良好であっても激しい運動は控えた方がよい。最大圧較差が50mmHg以上の高度狭窄例では、治療を受けるまでは運動は制限すべきである。同様に治療後のPRや進行性右室拡大例でも肺動脈弁置換手術を受けるまでは運動は制限すべきである。これらの例でも治療が奏効すれば運動を再開することが可能である。

## 評価法

PS解除術前の評価としては、PSは軽度から中等度であれば無症状なので、胸部X線上の肺動脈拡張所見や聴診上の心雑音といったルーチンの検査で発見されることもある。中等度ないし重度の狭窄例では右室肥大の進行や運動耐性の低下、呼吸困難、易疲労感、失神、胸痛、動悸などの自覚症状の出現が生じることがある。重度の狭窄例では卵円孔閉存や心房中隔欠損を介して右-左短絡が生じることにより軽度のチアノーゼやばち状指が見られるようになることがある。

PS解除術が成功した症例は通常無症状となり、理学的異常所見も目立たなくなる。しかし、二次的にPRを合併して労作時呼吸困難、易疲労感、動悸などを訴える患者が少数ながら発生する。また残存狭窄が進行する例も時に見られる。McCrinkleら<sup>3)</sup>の報告によれば、1981～1986年までにバルーン肺動脈弁形成術を受けた533人の患者を中期遠隔期まで追跡調査したところ、7%の患者で中等度ないし重度のPRが生

じ、狭窄解除術が成功して術直後の圧較差が36mmHg未満に減少していた患者のうち6.5%で再狭窄のために追加処置が必要になった。

理学的所見では、狭窄解除術成功患者には通常チアノーゼやばち状指を認めることはない。頸静脈波は正常となる。聴診上II音も正常であることが多い。収縮期に柔らかい雑音が第2肋間で聴取できることがある。PRを生じている例では短い拡張期雑音も聴取できる。運動負荷による心機能検査は小児や若年成人では術前よりも改善が期待できるが、中年以降では改善が見られないことが多い。

心電図所見においては、術前に見られた右室肥大の所見は軽快消失することが多い。外科手術を受けた症例では右脚ブロックが見られることがある。胸部X線像では左肺動脈の拡張は狭窄解除成功例であっても引き続き見られるが、心胸郭比は正常に復する。心エコー検査によって残存狭窄の程度やPRの有無、右心室のサイズとその機能を評価する。PRが重度の患者ではストレステストを行って心機能の予備能を評価する。

### PS解除術の適応

ここで言及するPS解除術とは、手術もしくはカテーテル治療によるものを指す。

孤立性弁性PSは現代では外科手術による治療の対象ではないといえる。圧倒的多数の症例ではバルーンカテーテルによる弁切開術の効果が非常に高い。ただ非常にまれに漏斗部の狭窄を合併する例においてtransannular patchまたは流出路パッチを用いた手術を要することがある。

ほかに左-右短絡がある場合は、たとえそれが心房中隔欠損に見られるときであっても肺動脈弁の圧較差は誇張されていることに留意すべきである。肺動脈弁が構造的に完全に正常であって、十分なサイズがあったとしても、左-右

短絡に伴って肺血流が増加しているときは圧較差が生じる。

PS症が弁レベルでの最大圧較差が50mmHg以上であるような中等度ないし重度の場合には、たとえ無症状であっても治療適応となる。経皮的バルーンカテーテル弁切開術が通常の治療手段であるが、特に石灰化や異形成(弁尖が厚くなっているが互いの癒合は見られない)弁などでは不成功に終わることがあり、このような場合には外科的手術による弁切開術や肺動脈弁置換を要するのが普通である。さらにNoonan症候群に見られるような弁上部狭窄は経皮的バルーンカテーテル弁切開術ではすぐに再発してしまうことが多い。経皮的バルーンカテーテル弁切開術は肺動脈弁の交連の裂開によって作用する、効果的で安全な治療法である。Stangerら<sup>4)</sup>が1990年に初めての大規模な経皮的バルーンカテーテル弁切開術の効果と安全性に関して発表した論文によれば、1981~1986年までの822例(主として小児で成人は35例のみ)を調査したところ、収縮期の弁レベルにおける圧較差は平均 $71 \pm 33$ mmHgから $28 \pm 21$ mmHgへと有意に減少したが、漏斗部狭窄がしばしば見られた。漏斗部で生じた圧較差は弁レベルの病変の重症度と無関係であったが、3~12カ月後には軽快した。このシリーズにおいての重大な合併症(死亡、血行動態の破綻、弁機能不全の固定化)の発生率は1%未満であり、外科手術と同等であった。Chenら<sup>5)</sup>の報告によれば経皮的バルーンカテーテル弁切開術を受けた成人患者53人でも収縮期の弁レベルにおける圧較差は平均 $91 \pm 46$ mmHgから $38 \pm 32$ mmHgへと有意に減少した。また肺動脈弁の開放径も平均 $8.9 \pm 3.6$ mmから $17.4 \pm 4.6$ mmへと有意に増加し、かつ少なくとも重度のPRは生じなかった。このようにChenらの成人の成績は小児の成績と同等であった。

## 再手術や再カテーテル治療の適応

残存狭窄が弁レベルあるいは漏斗部レベル(右室肥大が原因)のいずれにせよ、50mmHg以上である場合には再治療が考慮されるべきである。また初回治療で生じたPRが重度であった、そのために右心室の拡大が著明ないしは進行性の場合、および運動耐性が低下している場合、また心房性および心室性不整脈が継続する場合には、肺動脈弁置換手術の適応となる。

## 2) 肺動脈弁閉鎖不全症

## 病態

最重要な非医原性の肺動脈弁閉鎖不全(pulmonary regurgitation; PR)症の疾患は肺動脈弁欠損症候群であり、これはファロー四徴症の一亜型である。例外的に幼年期以降まで症状を有することなく経過して、それ以降に手術を受けることがある。

孤立性PR症は非常にまれな先天性心疾患であり、PRは多くの場合はファロー四徴症をはじめとする右室流出路の閉塞性疾患に対する修復術の際に行われた右室流出路再建術後に見られるものであるが、これらは長年にわたり悪性ではないと考えられてきた。しかし孤立性PR症は、PRが長期にわたって及ぼす影響を知る上では、他の影響を及ぼす可能性のある因子(チアノーゼ、心室中隔欠損、PS、手術による合併症など)がないので格好の疾患群としてとらえることができる。Shimazakiら<sup>6)</sup>は72人の孤立性PR症の調査の中で、20歳までは症状が出ていたのはわずかに6%であったが40歳では29%になっていて、その中の3人の患者が症状出現後平均39カ月で死亡したことを報告した。Hazard function解析では心不全症状の出現する率は主として40歳以降で幾何級数的に増加した。この報告結果はもう1つの代表的な右室容量負荷を強い疾患である心房中隔欠損におい

ても共通する。すなわち、右室容量負荷は左心室の変形をもたらすが、小児期または若年成人期に修復された場合は完全に可逆的である<sup>7,8)</sup>。

ファロー四徴症修復術後のPRの程度は経過中に増悪することがある。ファロー四徴症修復術直後では右室肥大が伴っているため、右室コンプライアンスは低く、また肺動脈中央部の容積は小さいか正常下限であり、また心拍数は比較的多いので拡張期はその分短い。従って、修復術直後は逆流の径は大きいにもかかわらず、このような多くの因子の組み合わせによってPRは軽度に制限されていることが多い。しかし時間経過とともに右心室の1回拍出量が増加するのに伴って肺動脈中心部が大きくなることでその容積が大きくなっていき、また右心室のコンプライアンスは回復する。年齢とともに心拍数が減少するのに伴って拡張期時間も増加していく。これらの組み合わせによって経過とともにPRは重症化することがまれではない。

PRによる右心室の容量負荷の右心室また左心室に与える影響が近年のいくつかの報告によって明らかになってきた。重症大動脈弁閉鎖不全が左心室に与える影響に関しては非常に多くの研究報告があるので、それらを参考にしてPRの影響を推論することができる。多くの研究者は慢性大動脈弁閉鎖不全の病期を4つに分けている。

## ①代償期

左心室は慢性大動脈弁閉鎖不全による容量負荷に反応して、拡張期容積が増加することに伴って圧容積曲線が右側移動して心室コンプライアンスが増加する。これによって拡張期容積が増加しても拡張末期圧は増加せずに維持される。また心室肥大が見られ、細胞レベルでは細胞サイズが大きくなり、心筋線維が追加され、コラーゲン含有量が低下する。以上の変化により、拡張期容積が増加しても心筋容積-心室容積比や、心筋線維の収縮末期応力や、収縮能は

維持される。1回拍出量が増加することによって全身循環血流量は維持される。この病期は数十年にわたって続くこともある。

#### ②代償機転の破綻

この病期では、左室拡大が進行しても、それに心室肥大が追いつかず心筋容積-心室容積比が減少し、後負荷すなわち収縮末期応力が増加する。その結果、心筋線維の短縮率が低下する。この病期の特徴として、左室心筋線維の短縮速度や左室駆出率などで代表される収縮能が低下するが、心筋収縮能自体は正常に維持されることが挙げられる。

#### ③さらなる左室拡大と後負荷とのミスマッチ、左室収縮機能、心筋収縮能の増悪

短い期間であれば心筋収縮能の低下は可逆的であり、大動脈弁の置換/形成術によって左心室の容量負荷を除去してやると完全な機能回復が得られることがある。

#### ④非可逆的心筋傷害

組織学的には心筋組織の線維化と間質のコラーゲンやフィブリノネクチンの増加が見られる。大動脈弁置換手術はやはり耐術可能で臨床的に軽快することがあるが、心筋の力学的な組織能は正常までには復しない。

心室の拡大に伴う生理的な心室肥大は、心室壁応力を正常に維持するために必須であるが、病期が進行すると線維化が生じることによる心室コンプライアンスの低下に伴って、この機転が破綻する。

右室容量負荷の動物実験で、重度の慢性大動脈弁閉鎖不全と酷似した点が多く報告されている。Kiriazisら<sup>9)</sup>は右室乳頭筋にin vitroで容量負荷をかける実験を行い、最大発生張力や他の心筋力学およびエネルギーの指標は、代償期の心室肥大では正常であったが、非代償期では減少していたことを示した。Kuehneら<sup>10)</sup>は心臓MRIとコンダクタンスカテーテルを用いて成長

前のブタにPRを作成し、その右心室と左心室の力学が受ける影響を調べ、右室駆出率、最大dP/dt、EmaxいずれもPR作成3カ月後の状態で低下することを示した。ドブタミン負荷に対する反応は右心室、左心室共に低下していて、右室機能が傷害されることに影響を受けて左室機能も低下することが示唆された。

このようにPRの病態はその病期によって心機能に種々の影響を与える。

#### 臨床経過

Murphyら<sup>11)</sup>と、Nollertら<sup>12)</sup>は別々にファロー-四徴症修復術後遠隔期の多数の患者を調査し、PRの臨床経過とその危険因子を報告している。いずれも術後20年を過ぎると死亡率が3倍近くに上昇することが示されている。また多くの報告を総合すると、ファロー-四徴症修復後の時間の経過とともに運動耐用能の低下、心不全、不整脈、および死亡が増加していく。また肺、腎、肝など心臓以外の臓器の問題が、しばしばこれらの患者の臨床経過を左右することが多い。

そのほかに遠隔期の死亡や重大合併症の危険因子については数多く報告されている。Khairyら<sup>13)</sup>は252人の患者の多施設での調査を行い、心室電気刺激プログラムにおける陽性結果、失神発作の既往、中等度ないし重度の肺動脈弁または三尖弁閉鎖不全、心電図でのQRS幅が180msec以上、胸部X線での心胸郭比が0.6以上の心拡大、および多種の心室性期外収縮が、突然死や心室頻拍になる危険因子であることを示した。Gatzoulis<sup>14)</sup>らは793人の6施設の患者を調査して、ファロー-四徴症修復術時の年齢が高いことと、心電図でのQRS幅が180msec以上であることの2つが突然死の独立危険因子であることを示した。中等度ないし重度のPRは心室頻拍や突然死した患者に多く見られる臨床的所見であった。三尖弁閉鎖不全の場合は上室性頻

拍が多く見られた。Harrisonら<sup>15)</sup>の報告によれば持続性心室頻拍が見られた患者では、右室流出路が動脈瘤化してPRとなっている傾向が見られた。Ghai<sup>16)</sup>はファロー四徴症修復術後遠隔期死亡の患者12人を125人の生存例と比較して、遠隔期死亡した患者では持続性心室頻拍の既往、心電図でのQRS幅が180msec以上であること、中等度ないし重度のPR、中等度ないし重度の左室機能不全が見られたことを報告した。心電図でのQRS幅は右心室のサイズと密接な関係があることが知られている<sup>17)</sup>。またKnauthら<sup>18)</sup>は心臓MRIで測定した右心室のサイズが大きいことと修復時年齢が高いことの2つを、遠隔期死亡、重症不整脈、心不全の予見因子として挙げている。

### 評価法

PRはその評価法が困難である。心エコーや心臓カテーテル検査などの従来の評価法ではPRの定量的評価に技術的限界がある。これは主として右心室の形状が左心室に比較して立体的に複雑であることに起因している。一般的にはこれらの評価法を用いても中等度以上の臨床的に意味のあるPRか否かが判明できる程度である。従ってこれらの所見を基にして臨床症状でPRを評価しているのが現状である。しかし1990年代になってPRの定量的な評価が可能となりはじめ、右室メカニクスに与える影響を論じることができるようになった。心臓MRIは心室の容積、心室壁容積、機能、および逆流量を定量化することが可能であり、ファロー四徴症修復術後の患者における右室メカニクスと臨床経過の関係が明らかになってきた。まずPRの程度と右室拡張期径は密接な相関関係があることが分かった<sup>19, 20)</sup>。また重度慢性大動脈弁閉鎖不全の際における左室機能の場合と同様に、慢性PRでも初期では右室収縮機能が温存される。この病期は数年間も持続し、多くの例では比較

的無症状であることが多い。しかし、いったん代償機転が破綻すると、右室心筋容積-心室容積比が減少して収縮末期容積が増加し、駆出率が低下する。Kurotobiら<sup>21)</sup>は右室壁張力(後負荷)の増加、右室駆出率の低下、および症状の相関関係を示し、PRに対する手術時期に対してもより客観的な評価が可能になりつつある。

### 手術適応

手術適応となるPRの多くはtransannular patchを用いたファロー四徴症修復術が行われた遠隔期に生じるものである。多くの施設ではtransannular patchによるファロー四徴症修復術後数十年経過後に肺動脈弁挿入術の適応となった例は比較的まれである<sup>22)</sup>。しかし1980年代以前に行われたものは、それ以降のものよりも術後同時期に発生するPRが多い。これは当時の修復術では右室切開が長く、右室心筋切除範囲が広く、心筋保護の精度が低く、経心房による心室中隔欠損閉鎖の頻度が少なかったことなどが影響しているものと考えられる。PRはその評価法が困難であることもあって、PRに対する手術すなわち肺動脈弁挿入術の適応をも含めた管理も議論が分かれている。

比較的一致した手術適応はPRで説明可能な心不全症状の出現である。この場合では、肺動脈弁挿入が心不全症状の改善をもたらすと報告が多くされている<sup>23-25)</sup>。このうちChandarら<sup>23)</sup>はこの再手術によってNYHA心機能分類上少なくとも1度は改善することを示している。Ilbawiら<sup>24)</sup>は2~20年後に行った49症例を報告している。この施設での適応基準は進行性の心拡大、または右心室の拡大やその機能低下の所見が得られた場合としている。そのほかにNew England Medical Center<sup>26)</sup>やMayo Clinic<sup>27)</sup>なども遠隔期の肺動脈弁挿入術の有効性を挙げている。

しかし患者が無症状の重度PRに関しては現

■表1 肺動脈弁閉鎖不全の手術適応

PR自体が中等度以上であり、かつ
①他に説明できない心不全症状を有するPR
②心室機能の低下（無症状であっても）
③進行性の右室拡大（無症状であっても）
④中等度以上の三尖弁閉鎖不全と合併する（無症状であっても）
⑤頻発する心房性または心室性頻拍型不整脈と合併する（無症状であっても）
など

時点では一致した手術適応がない。無症状であってもPRが長期に及ぶと心室機能<sup>28)</sup>や運動能<sup>29)</sup>に悪影響を及ぼすことが示されている。三尖弁閉鎖不全が合併した場合の多くはPRと相まってこれらに付加的な悪影響を及ぼすことが考えられる。また心室性または心房性頻拍型不整脈が無症状のPRに伴う場合、これらは心房や心室の容量負荷の続発症である可能性がある。一方で待機的PRの早期遠隔期成績を見ると、手術死亡率が1.1%、再手術後90%の患者がNYHA心機能分類上I度で10年生存率が95%と報告されている<sup>30)</sup>ように極めて良好である。従って、リスクと得られる利益のバランスから手術適応を考えた場合、無症状であることが手術適応から逸脱するものではないと考えることができる。

理論的には大動脈弁と同様に、右室系の進行性の拡大が見られた後で、かつ右室心筋の不可逆的な病理学的変化が生じる前の病期ということになるが、この最適な時期を見つけるための複合的な評価法はいまだ確立されていないのが現状である。

筆者らが考える現時点における手術適応を表1に示す。

すでに経皮的カテーテルによる弁挿入術<sup>21)</sup>が開発されていることから、近い将来はこの方法が外科手術に取って代わる可能性がある。

### 3) 肺動脈弁に対する術式

本疾患に対する外科的手術を歴史的に見る

と、1948年Brock<sup>31)</sup>がclosed（閉鎖式）弁切開術を初めて試行して以来、人工心肺を用いて直視下に弁組織を切開する方法や、余剰弁尖組織の切除術が行われてきた。しかし、1990年代以降はバルーン肺動脈弁形成術が本病変に対する主な治療手段となっていて、孤立性PSは原則として外科手術による治療の対象ではなく、また孤立性PRは極めてまれである。従って肺動脈弁に対する外科手術の大部分は先天性心疾患に伴う一部分か、もしくはそれに対する再手術であり、その内訳は以下の3つの術式に大別することが可能である。

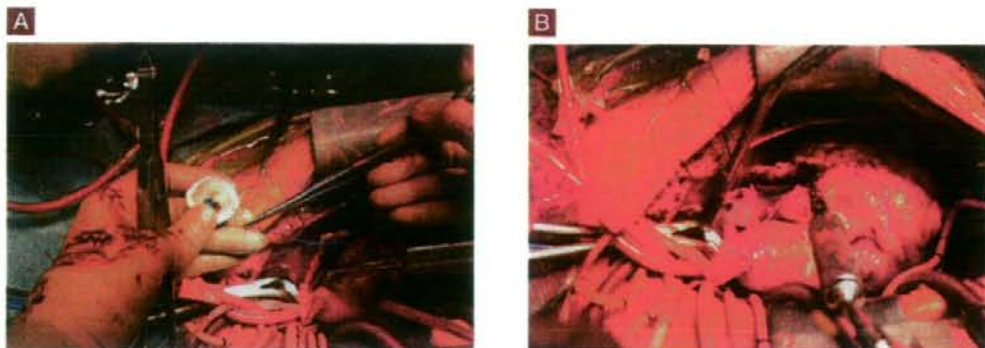
#### 肺動脈弁置換（挿入）術

成人サイズに達した初回または再手術におけるPSまたはPRがその対象である。人工心肺を確立し、他の大動脈遮断下の心内操作の後、心拍動下に行うことが多い。

弁を挿入する位置については必ずしも本来の肺動脈弁輪にこだわる必要はなく、最も大きなサイズのものが入り可能な位置を選択するが、peelの滑落による人工弁の閉塞を予防する意味では導管またはバッチの近位側が有利である。弁縫合輪への縫着方法に関しては特に制限はないが、筆者らは再弁置換となる可能性を考慮して人工弁を除去する際に血管内膜への損傷を最小限にするためにプレジェットなどの補強材料を使わず、3-0ポリプロピレン糸による連続縫合で行っている（図1）。

#### 弁の種類を選択

生体弁（同種弁を含む）と機械弁の選択基準



■ 図1 成人ファロー四徴症の修復術における肺動脈弁挿入（左側が患者頭側）

A スtent生体弁縫合輪に3-0 ポリプロピレン糸を用いて連続縫合を始める。

B 挿入するレベルは必ずしも元の肺動脈弁輪に一致させる必要はない。この症例では肺動脈主幹部遠位の高さに挿入している。

には現在まで一定の意見はないが、生体弁の方が使用実績は圧倒的に多い。小児心臓外科医は伝統的に生体弁を用いた右室流出路再建術を行ってきたために患者が成人になった後の再手術においても同種類（生体弁）の弁を選択する傾向がある。

生体弁を肺動脈弁位に用いた術後10年までの中期遠隔期成績は生命や心事故発生に関して数多くの報告<sup>32, 33)</sup>があり、現世代の異種生体弁の中期遠隔期の成績は同種弁のそれとほぼ同等にまで改善されてきている<sup>34, 35)</sup>。従って遠隔期成績の差を理由として同種生体弁を積極的に選択する論理的背景は現代では消失している。

機械弁を肺動脈弁に使用する場合に考慮すべき点を以下に述べる。肺動脈弁は肺動脈圧が正常もしくは中等度までの高血圧であるほとんどの場合、開放閉鎖に導く圧較差が、大動脈弁や僧帽弁はもちろんのこと三尖弁に比較しても少なくなるので血栓弁になりやすい。従ってこの論点からは、他の位置の機械弁置換以上に嚴重な（INR値が高値での）抗凝固療法が求められる。このように適切な抗凝固療法を行ったとしても生涯にわたって血栓塞栓症と同時に出血性合併症のリスクがある。肺動脈弁位に機械弁が用いられた後の血栓弁の発生も多く報告されて

いる。ただしこれらのシリーズの中には、抗凝固療法が行われていなかったものや不適切であったものが含まれている。しかし一方では規模の小さい血栓塞栓症は直接肺動脈の末梢に向かうので、僧帽弁または大動脈弁位に比較すると耐性は高い。拳児希望の若年女性では特にワルファリンによる抗凝固療法を避けることは重要である。また生体弁の遠隔期における交換のための再手術または再々手術のリスクは低い。

出血性合併症のリスクも累積的である。成人に達している先天性心疾患の患者の大部分は若年者であるので、これらの患者年齢層を弁選択の際の考慮に入れるべきである。

生体弁の場合と同様に経過観察中の心エコーによる定期的なチェックは必要であり、その中で弁周囲のパンヌス形成や右室肺動脈導管が用いられている場合にはその内側のpeel形成を観察し、これらが閉塞を起こす前に再手術をする必要がある。

以上の論点を考慮に入れると、機械弁を選択する場合は、将来の再手術の際に再開胸操作によりlacerationが生じる危険が高い解剖的な心大血管の位置関係があり、かつ機械弁を用いることによって確実にもしくはほぼ確実に再手術が不要となるような場合、心房細動など他の理

由によりワルファリン療法を要する場合などの特殊なケースに限定される。

将来は現在研究が進みつつある tissue-engineering によって作成された弁を用いることが予想される。

### 弁性PS解除術

PS解除は、初回または再手術において他の先天性心疾患との合併症として存在するPSが手術の対象となる。弁置換術のときと同様に人工心肺を確立し、他の大動脈遮断下の心内操作の後、心拍動下に行うことが多い。

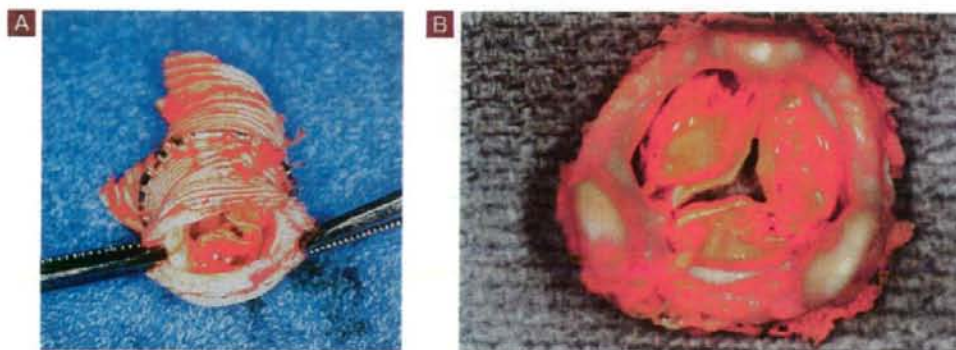
弁尖癒合によるPSの場合には弁の肥厚変性が中等度以下でかつ肺動脈弁交連の癒着が見られれば交連切開術を行う。大動脈弁と異なり、軽度のPRは許容されるので、弁輪（肺動脈壁）内に及ぶまで深く切開を入れる。

肺動脈弁輪狭窄例では肺動脈弁輪を切開し、弁付きパッチを用いて弁輪を拡大する transannular patch 術式となる。まず弁輪の遠位側または近位側に小切開を置いて肺動脈弁交連部の位置を確認する。二尖弁の形態を取ることがしばしば見られ、その場合交連部が前後である場合と左右である場合がある。可動性が豊富な弁

尖がある場合には温存することが望ましい。この場合には温存した弁尖と coaptation がマッチする位置に Gore-tex<sup>®</sup> などの 1 弁を取り付ける。自己肺動脈弁が可動性に乏しい場合にはこれを切除し、1 弁付きパッチはその反対側の肺動脈壁と十分な coaptation を取るようなサイズと形状にデザインする。筆者らは弁を取り付ける位置の肺動脈切開線の 2 点間の肺動脈壁に沿う距離を糸で測定して、扇状に 1 弁を作成している。

### 心外導管の交換術

小児期に行われた右室肺動脈心外導管における、患者成長に伴う相対的な導管の outgrowing、導管内に挿入した生体弁の石灰化に伴う可動制限、導管内側面に付着する peel の蓄積またはその滑落（図2）、導管の感染などが交換の適応である。前回の手術で用いられた右室流出路再建術式でパッチや心外導管の胸骨胸壁への癒着度合いをCTなどの画像検査で評価して、開胸操作中に心大血管壁の laceration が生じるリスクが高いケースでは送血部位を大腿動脈や腋窩動脈に、また脱血部位を大腿静脈から Edwards Lifesciences 社製 research medical FEM II カニューーラなど多孔性静脈カニューーラで確保して、



■ 図2 摘出された心外導管

生体弁内挿のダクロン<sup>®</sup>人工血管を用いた右室肺動脈心外導管修復術後の心外導管交換術の際に摘出された心外導管、生体弁の高度石灰化 (A) と人工血管内面と外面に形成された peel (B) が認められる。



lacerationの際にはfull flowによる人工心肺運転が可能となるように準備してから、開胸操作を行う。

ほかに心内操作がない場合には大動脈遮断をせずに行うことが多い。術前の画像検査で心室レベルでの遺残短絡が認識されていない場合でも、高い右室圧によってマスクされている可能性を考慮すべきである。まず二酸化炭素ガスを術野に充満させておき、万一の際にガス塞栓症を生じるリスクを最小限にする。左心系への空気(ガス)混入に対してはTrendelenburg体位を取り、大動脈基部に挿入したカニューラを用いて持続的な空気抜きを行い、心室rapid pacingで心室の空気(ガス)の引き込みを最小限とする工夫を行う。

原則的には前回手術で挿入されている心外導管を全切除する。切除した後の後壁は通常導管の外側に厚いpeel自己線維組織で形成されている。このpeelからなる導管床をそのまま新しい後壁として利用し、人工血管から舟形に切り出したパッフルを前壁(屋根)にして縫着する<sup>36)</sup>。この方法の成績は良好で、再導管交換術回避率は非常に高い<sup>37)</sup>。前回使用されている心外導管の材質がダクロン®の場合は導管床の形成が顕著であり、この方法が容易に行える。材質がホモグラフトなどの生体材料やPTFE (polytetrafluoroethylene) の場合にはしばしば導管床の形成が乏しいので、この組織を用いて縫合することが困難なことが多く、新しい導管を導管の形状のまま遠位側、近位側それぞれに縫合する。

#### ■引用・参考文献

- 1) Hayes, CJ. et al. Second natural history study of congenital heart defects: results of treatment of patients with pulmonary valvar stenosis. *Circulation*. 87 (suppl 1), 1993, I-28-37.
- 2) Kopeckey, SL. et al. Long-term outcome of patients undergoing surgical repair of isolated pulmonary valve stenosis. *Circulation*. 78, 1988, 1150-6.
- 3) McCrindle, BW. Independent predictors of long-term results after balloon pulmonary valvuloplasty. *Circulation*. 89, 1994, 1751-9.
- 4) Stanger, P. et al. Balloon pulmonary valvuloplasty: results of the valvuloplasty and angioplasty of congenital anomalies registry. *Am J Cardiol*. 65, 1990, 775-83.
- 5) Chen, CR. et al. Percutaneous balloon valvuloplasty for pulmonic stenosis in adolescents and adults. *N Engl J Med*. 335, 1996, 21-5.
- 6) Shimazaki, Y. et al. The natural history of isolated congenital pulmonary valve incompetence: Surgical implications. *Thorac Cardiovasc Surg*. 32, 1984, 257-9.
- 7) Roos-Hesselink, JW. et al. Excellent survival and low incidence of arrhythmias, stroke and heart failure long-term after surgical ASD closure at young age: A prospective follow-up study of 21-33 years. *Eur Heart J*. 24, 2003, 190-7.
- 8) Pascotto, M. et al. Global and regional left ventricular function in patients undergoing transcatheter closure of secundum atrial septal defect. *Am J Cardiol*. 96, 2005, 439-42.
- 9) Kiriazis, H. et al. Mechanical and energetic changes in short-term volume and pressure overload of rabbit heart. *Heart Vessels*. 7, 1992, 175-88.
- 10) Kuehne, T. et al. Effects of pulmonary insufficiency on biventricular function in the developing heart of growing swine. *Circulation*. 108, 2003, 2007-13.
- 11) Murphy, JG. et al. Long-term outcome in patients undergoing surgical repair of tetralogy of Fallot. *N Engl J Med*. 329, 1993, 593-9.
- 12) Nollert, G. et al. Long-term survival in patients with repair of tetralogy of Fallot: 36-year follow-up of 490 survivors of the first year after surgical repair. *J Am Coll Cardiol*. 30, 1997, 1374-83.
- 13) Khalry, P. et al. Value of programmed ventricular stimulation after tetralogy of Fallot repair: A multicenter study. *Circulation*. 109, 2004, 1994-2000.
- 14) Gatzoulis, MA. et al. Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy

- of Fallot : A multicentre study. *Lancet*. 356, 2000, 975-81.
- 15) Harrison, DA. et al. Sustained ventricular tachycardia in adult patients late after repair of tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol*. 30, 1997, 1368-73.
  - 16) Ghai, A. et al. Left ventricular dysfunction is a risk factor for sudden cardiac death in adults late after repair of tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol*. 40, 2002, 1675-80.
  - 17) Abd El Rahman, MY. et al. Relation between right ventricular enlargement, QRS duration, and right ventricular function in patients with tetralogy of Fallot and pulmonary regurgitation after surgical repair. *Heart*. 84, 2000, 416-20.
  - 18) Knauth, A. et al. Right ventricular size and function and age at repair predict major adverse outcomes late after tetralogy of Fallot repair. *Circulation*. 112, 2005, II-681 (abstr).
  - 19) Lytrivi, ID. et al. Regional differences in right ventricular systolic function as determined by cine magnetic resonance imaging after infundibulotomy. *Am J Cardiol*. 94, 2004, 970-3.
  - 20) Davlouros, PA. et al. Right ventricular function in adults with repaired tetralogy of Fallot assessed with cardiovascular magnetic resonance imaging : Detrimental role of right ventricular outflow aneurysms or akinesia and adverse right-to-left ventricular interaction. *J Am Coll Cardiol*. 40, 2002, 2044-52.
  - 21) Kurotobi, S. et al. Determination of timing for reoperation in patients after right ventricular outflow reconstruction. *Am J Cardiol*. 95, 2005, 1344-50.
  - 22) Lillehei, CW. et al. The first open heart corrections of tetralogy of Fallot : A 26-31 year follow-up of 106 patients. *Ann Surg*. 204, 1986, 490-502.
  - 23) Chandar, JS. et al. Ventricular arrhythmias and biventricular dysfunction after repair of tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol*. 65, 1990, 655-61.
  - 24) Ilbawi, MN. et al. Long-term results of porcine valve insertion for pulmonary regurgitation following repair of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg*. 41, 1986, 478-82.
  - 25) Misbach, GA. et al. Pulmonary valve replacement of regurgitation after repair of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg*. 36, 1983, 684-91.
  - 26) Warner, KG. et al. Restoration of the pulmonary valve reduces right ventricular volume overload after previous repair of tetralogy of Fallot. *Circulation*. 88, 1993, II, 189-97.
  - 27) Finck, SJ. et al. Pulmonary valve insertion during reoperation for tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg*. 45, 1988, 610-3.
  - 28) Marx, GR. et al. Noninvasive assessment of hemodynamic responses to exercise in pulmonary outflow obstruction. *Am J Cardiol*. 61, 1988, 595-601.
  - 29) Bove, EL. et al. The influence of pulmonary insufficiency on ventricular function following repair of tetralogy of Fallot : evaluation using radionuclide ventriculography. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 85, 1983, 691-6.
  - 30) Yemets, IM. et al. Pulmonary valve replacement late after repair of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg*. 64, 1997, 526-30.
  - 31) Bonhoeffer, P. et al. Percutaneous insertion of the pulmonary valve. *J Am Coll Cardiol*. 39, 2002, 1664-9.
  - 32) Lange, R. et al. Performance of allografts and xenografts for right ventricular outflow tract reconstruction. *Ann Thorac Surg*. 71, 2001, S365-7.
  - 33) Homann, M. et al. Reconstruction of the RVOT with valved biological conduits : 25 years experience with allografts and xenografts. *Eur J Cardiothorac Surg*. 17, 2000, 624-30.
  - 34) Breymann, T. et al. Bovine valved venous xenografts for RVOT reconstruction : results after 71 implantations. *Eur J Cardiothorac Surg*. 21, 2002, 703-10.
  - 35) Erez, E. et al. Repeat right ventricular outflow tract reconstruction using the Medtronic Freestyle porcine aortic root. *J Heart Valve Dis*. 15, 2006, 92-6.
  - 36) Danielson, GK. et al. Replacement of obstructed extracardiac conduits with autogenous tissue reconstructions. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 93, 1987, 555-9.
  - 37) Bermudez, CA. et al. Late results of the peel operation for replacement of failing extracardiac conduits. *Ann Thorac Surg*. 77, 2004, 881-7.

# Influence of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells *in vitro*

Miki Yamaguchi,<sup>1</sup> Mitsuhiro Fujihara,<sup>1</sup> Shinobu Wakamoto,<sup>1</sup> Hiromi Sakai,<sup>2</sup> Shinji Takeoka,<sup>3</sup> Eishun Tsuchida,<sup>2</sup> Hiroshi Azuma,<sup>1</sup> Hisami Ikeda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Japanese Red Cross, Hokkaido Red Cross Blood Center, Yamamoto 2-2, Nishi-Ku, Sapporo 063-0002, Japan

<sup>2</sup>Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1 Okubo, Shujuku, Tokyo 169-8555, Japan

<sup>3</sup>Consolidated Research Institute for Advanced Science and Medical Care, Waseda University, 3-4-1 Okubo, Sinjuku, Tokyo 169-8555, Japan

Received 25 April 2007; revised 21 August 2007; accepted 16 October 2007

Published online 6 February 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.31857

**Abstract:** Hemoglobin vesicles (HbVs), liposomal oxygen carriers containing human hemoglobin, are candidates for development as clinically useful blood substitutes. Although HbVs are shown to distribute transiently into the bone marrow in animal models, the influence of HbVs on human hematopoietic stem/progenitor cells has not yet been studied. Therefore, we investigated the influence of HbVs at a concentration of up to 3 vol/vol % on the clonogenic activity (in semisolid culture) and proliferative activity (in liquid culture) of human hematopoietic progenitor cells derived from umbilical cord blood (CB) *in vitro*. Continuous exposure of CB mononuclear cells to HbVs tended to decrease the number and size of mature-committed colonies and most notably reduced the number of colonies of high-proliferative potential colony-forming cells (HPP-CFC). In contrast, exposure to HbVs for 20 h or 3 days,

which is more relevant to the clinical setting, had no effect on the number of mature-committed colonies and only modestly decreased the number of HPP-CFC. Continuous exposure (10 days) to HbVs significantly suppressed the cellular proliferation and differentiation of both the erythroid and myeloid lineages in liquid culture. Again, short exposure (20 h or 3 days) did not affect these parameters. Thus, our results show that HbVs, under conditions relevant to the clinical setting, have no adverse effect on human CB hematopoietic progenitor activity *in vitro*. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 88A: 34–42, 2009

**Key words:** liposome-encapsulated hemoglobin; hemoglobin-vesicles; hematopoietic progenitor cells; colony assay; biocompatibility

## INTRODUCTION

Hemoglobin vesicles (HbVs) or liposome-encapsulated Hbs comprise human hemoglobin encapsulated within a phospholipid bilayer membrane and have been developed as an artificial oxygen carrier.<sup>1–3</sup> Several studies have demonstrated that the HbVs transport oxygen as efficiently as red blood cells,<sup>4–7</sup> making them a promising candidate for clinical trials.

HbVs are injected intravenously, therefore, the biocompatibility of HbVs with blood components is of

primary importance to ensure the safety of these materials for clinical use. We have evaluated this biocompatibility by investigating the influence of HbVs on human blood cells as well as plasma *in vitro* and shown that HbVs are highly biocompatible with human blood.<sup>8–10</sup>

It has been clearly demonstrated that intravenously injected liposome products for drug delivery are eventually captured by the reticuloendothelial system (RES), such as Kupffer cells in the liver and macrophages in the spleen and bone marrow.<sup>11</sup> A study in which technetium-99m-labeled HbVs were infused into animals demonstrated that the HbVs were mainly distributed in the liver, spleen and bone marrow,<sup>12</sup> and another histopathological study clarified that the HbVs are promptly metabolized in the RES.<sup>13</sup> Because the clinical utilization of an artificial oxygen carrier as a transfusion alternative would result in the substitution of a large volume of blood,

Correspondence to: M. Fujihara; e-mail: fujihara@hokkaido.bc.jrc.or.jp

Contract grant sponsors: Health and Labor Sciences Research Grants (Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices), Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, and Oxygenix Inc., Tokyo, Japan

it is important to elucidate the influence of HbVs on subsequent hematopoiesis. There has been concern over whether the HbVs distributed into bone marrow might adversely affect hematopoiesis, because the bone marrow is the major site of hematopoiesis. From this point of view, rats that received an acute 40% exchange-transfusion with HbVs showed complete recovery of the hematocrit within 7 days due to the elevated erythropoietic activity.<sup>14</sup> Furthermore, the number of red blood cells, leukocytes, and platelets remained unchanged for 1 week after the infusion of HbVs at 20% of the whole blood volume.<sup>15</sup> The findings in these animal models strongly suggest the absence of inhibitory activity of HbVs against hematopoiesis. However, the influence of HbVs on the human hematopoietic stem/progenitor cells has not yet been studied.

*In vitro* models of hematopoiesis, such as colony-forming assays, have been widely used to investigate the proliferation and differentiation of both of pluripotent hematopoietic stem cells and different progenitor cells of blood cell lineages [e.g., burst-forming units of erythrocyte (BFU-E) and colony-forming units of granulocytes/macrophages (CFU-GM)]. These techniques appear to be useful for investigating the pathogenic mechanisms of drug-induced blood disorders and also for screening the safety of compounds in preclinical testing.<sup>16</sup>

In this study, therefore, we sought to evaluate the influence of HbVs on the clonogenic activity of human umbilical cord blood (CB) hematopoietic cells, which are rich in hematopoietic stem/progenitor cells. In addition, we investigated the effect of HbVs on the proliferation and differentiation of both the erythroid and myeloid lineages of CB hematopoietic cells in liquid culture.

## MATERIAL AND METHODS

### HbVs

HbVs were prepared under sterile conditions, as described previously.<sup>17,18</sup> The Hb was purified from outdated donated blood provided by the Japanese Red Cross Society (Tokyo, Japan). The encapsulated Hb solution (38 g/dL) contained 14.7 mmol/L pyridoxal 5'-phosphate (PLP) as an allosteric effector at a molar ratio of [PLP]/[Hb] of 2.5. The lipid bilayer was composed of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine, cholesterol, 1,5-O-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (Nippon Fine Chemical, Osaka, Japan), and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-[poly(ethylene glycol) (5,000)] (NOF, Tokyo, Japan) at a molar ratio of 5:5:1:0.033. In some experiments, empty liposomes, which have the same constituents as HbVs, except for the absence of Hb, were used. The concentration of lipopolysaccharide, measured by a modified Limulus test, was less than 0.4 EU/mL.<sup>19</sup>

The physicochemical parameters were  $P_{50}$ , 27 Torr;  $262 \pm 77$ -nm particle diameter; and MetHb content <3%. The concentration of Hb in the HbVs dispersion was adjusted to 10 g/dL. The concentration of HbVs in this study was set at about 3 vol/vol %, based on the following rationale. Intravenously injected HbVs are eventually captured by phagocytes in the RES, including the spleen, liver, and bone marrow. The half-life of HbVs in the circulation in humans has been estimated to be 66 h by the study of circulation kinetics using rats and rabbits,<sup>12</sup> and the percent infused dose of HbVs of bone marrow in humans was estimated to be 6.4% at 48 h after 25% top loading of HbVs, in studies of the organ distribution of HbVs in rats and rabbits.<sup>12</sup> Based on this estimation, the distribution of HbVs in the human bone marrow at 48 h after infusion at 25 vol/vol % (1225 mL of HbVs) of the blood volume (4.9 L, 70 mL/kg, body weight) in a 70-kg individual may be expected to be 78.4 mL (6.4 vol/vol % of the infused dose of HbVs). The volume of the bone marrow space has been estimated as 2.6–4 L in an average-sized human (70 kg).<sup>20</sup> From these values, the amount of HbVs in the human bone marrow can be calculated to be about 2–3 vol/vol %.

### Preparation of human CB

Use of human umbilical CB for the experiments was approved by the Committee of Hokkaido CB Bank. CB was obtained during normal full-term deliveries. CB CD34<sup>+</sup> cells were prepared as described previously.<sup>21</sup> In brief, after sedimentation of red blood cells by incubating the CB samples with the same volume of 6% (w/v) hydroxyethyl starch dissolved in Ringer's solution (Veen-D, Nikken Chemical, Tokyo, Japan) at room temperature for 30 min, the low-density (<1.077 g/mL) mononuclear cells were collected with Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). For some experiments, the cells were further enriched with CD34<sup>+</sup> cells using a MACS CD34 Progenitor Isolation Kit (Milenyi Biotech, Bergish-Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. In all experiments, the purity of the CD34<sup>+</sup> cells was >85%.

### Clonal cell culture

The methylcellulose clonal culture was performed in 35-mm suspension culture dishes (Nippon Becton Dickinson [BD], Tokyo, Japan). The population of CD34<sup>+</sup> cells among the mononuclear cells was determined by flow cytometry, and the CB-derived mononuclear cells were seeded at 300 CD34<sup>+</sup> cells/dish. A complete methylcellulose medium for human clonal culture assays (Methocult GFH4434V; Stem-Cell Technologies, Vancouver BC, Canada) was used. The presence of up to 3% HbVs did not interfere with the microscopic detection of the colonies formed.

After 14 days incubation at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, the BFU-E, CFU-GM, CFU-Mix, and colony-forming units in culture (CFU-C) were scored under an inverted microscope. Densely packed colonies that reached >1 mm in size were scored as high proliferative potential colony-forming cells (HPP-CFC) after 28 days incubation. In some experiments, the CB-derived

mononuclear cells were suspended to obtain 1500 CD34<sup>+</sup> cells/mL in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Gibco BRL, Rockville, MD) containing 30% FCS (Equitech Bio, Igram, TX), 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemical, St Louis, MO), 10 ng/mL human interleukin-3 (IL-3), 10 ng/mL human stem cell factor (SCF, provided by Kirin Brewery, Tokyo, Japan), 10 ng/mL granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, a gift from Chugai Pharmaceutical, Tokyo, Japan), and 50 U/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Schering Research, Bloomfield, NJ). Then, different concentrations of HbVs were added to the cell suspension. The cells were incubated either for 20 h or for 3 days. Subsequently, they were recovered, washed to remove the HbVs, and resuspended in 5 mL of MethoCult GF. One milliliter of the resultant cell suspension (by adjusting CD34<sup>+</sup> cells to 300 cells/dish) was seeded into a 35-mm dish for the clonal assay.

### Liquid culture

CD34<sup>+</sup> cells enriched from CB-derived mononuclear cells were suspended in 4 mL of the following culture media and seeded in 12.5-cm<sup>2</sup> flasks (Nippon BD, Tokyo, Japan). The culture medium for the erythroid lineage was IMDM-containing 30% FBS, 1% BSA, 10 ng/mL human IL-3, 10 ng/mL human SCF, and 2 U/mL human erythropoietin (provided by Chugai Pharmaceutical). The culture medium for the myeloid lineage was IMDM-containing 30% FBS, 1% BSA, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 ng/mL human IL-3, 10 ng/mL human SCF, 10 ng/mL G-CSF, and 50 U/mL GM-CSF. These combinations of cytokines have been shown to promote proliferation and differentiation of CD34<sup>+</sup> cells toward mature erythroid and myeloid lineage cells, respectively.<sup>22,23</sup> Various concentrations of HbVs were added to the medium containing the cells. After 10 days incubation at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, the total cell counts were determined. CD235a<sup>+</sup> (glycophorin A) cells for the erythroid lineage and CD15<sup>+</sup> cells for the myeloid lineage, respectively, were analyzed by flow cytometry. For determining the effects of short-term exposure, the cells were incubated with HbVs for either 20 h or 3 days, washed to remove the HbVs, and then incubated for a total of 10 days.

### Flow-cytometric analysis

Aliquots of cells were stained with monoclonal antibodies in PBS/0.1% BSA at 4°C for 30 min. The analysis was performed using a BD LSR flow cytometer (BD Biosciences Immunocytometry System, San Diego, CA). The following monoclonal antibodies were used: FITC-conjugated CD34 (Nippon Becton Dickinson [BD]) antibody, PE-conjugated CD235a and CD33 (DAKO) antibodies, FITC-conjugated CD15 (DAKO) antibody, and APC-conjugated CD45 (BD) antibody. FITC- and PE-conjugated mouse IgG1 antibodies (BD), APC-conjugated mouse IgG1 (BD), and FITC-conjugated IgM (DAKO) antibodies were used as isotype-matched controls. In the flow-cytometric analysis, dead cells were gated out first by propidium iodide staining

and then with a forward versus side scatter window. For each analysis set, at least 10,000 events were collected.

### Histological staining

Cultured cells ( $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4/100 \mu$ L) were centrifuged onto slides with Cytospin (Shandon, Pittsburgh, PA) and stained with May-Grünwald-Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany). Microscopic images were captured with an MP5Mc/OL digital camera (Olympus) and processed using Win Roof software, version 5.5.

### Statistical analysis

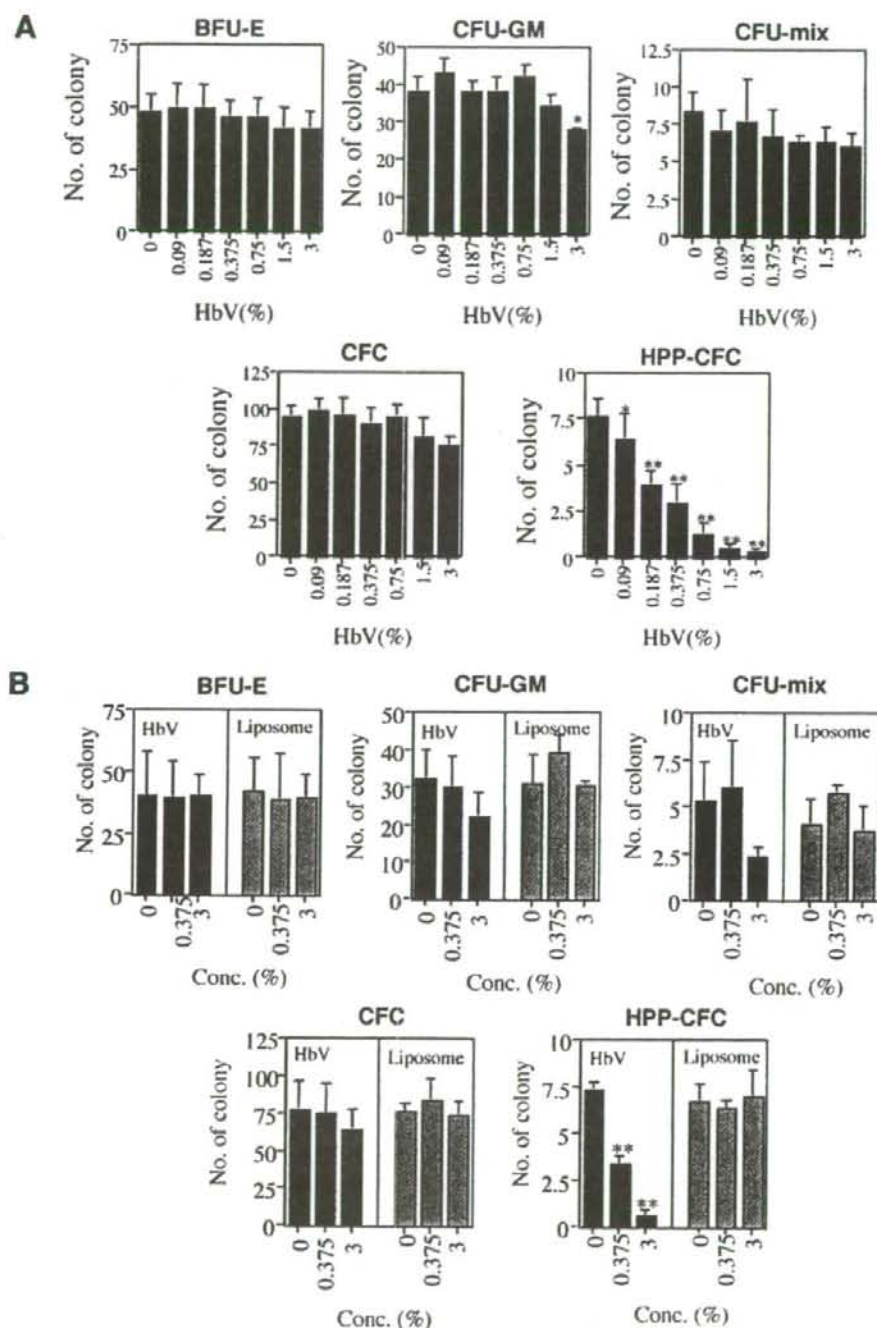
Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). A two-way paired ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni's test was used for comparisons of multiple HbV-treated groups with the control (HbV; 0%) group. For analysis of the difference between two exposure times, unpaired two-tailed Student's *t* test was used. Values of *p* < 0.05 were considered significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

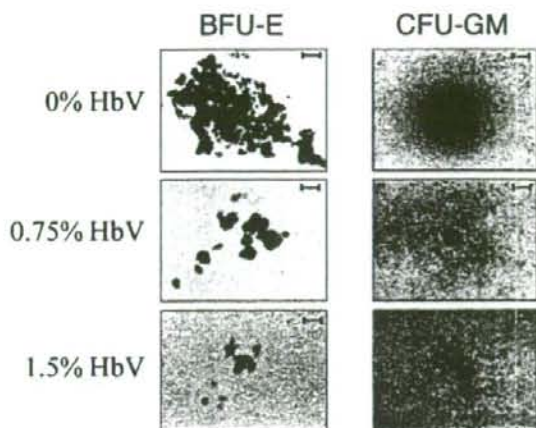
### Clonogenic potential of CB hematopoietic cells

We first examined the effect of continuous exposure to HbVs (0.09%–3%) on the formation of BFU-E, CFU-GM, CFU-Mix, CFC, and HPP-CFC in the clonogenic assay. HbVs at 3% inhibited the formation of CFU-GM and tended to decrease the formation of CFC-C. Most notably, HbVs significantly inhibited the formation of HPP-CFC in a concentration-dependent manner (Fig. 1A). Although no change in the number of colonies of BFU-E was noted, the size of the colonies of BFU-E and CFU-GM tended to be smaller in the presence than in the absence of HbVs (Fig. 2). On the other hand, the empty liposomes (phospholipid vesicles devoid of Hb) had no inhibitory effect on the formation of mature-committed colonies or HPP-CFC (Fig. 1B).

As continuous exposure to HbVs had a marked inhibitory effect on the formation of HPP-CFC, we examined the effect of short-term exposure of CB hematopoietic cells to HbVs. Toward this end, the CB hematopoietic cells were exposed to HbVs for 20 h or for 3 days, washed to remove the HbVs, and then subjected to a clonogenic assay. Exposure to HbVs for 20 h had no inhibitory effect on the formation of either HPP-CFC or other mature-committed colonies (Fig. 3). Exposure to 3% HbVs for 3 days modestly inhibited the formation of HPP-CFC, however, a greater number of HPP-CFC was formed when compared with that observed under continuous exposure to HbVs. No effect was observed on the formation of



**Figure 1.** A: Effects of HbVs on the clonogenic activity of CB-derived hematopoietic cells. B: Effects of empty liposomes on the clonogenic activity of CB-derived hematopoietic cells. CB-derived mononuclear cells were seeded at 300 CD34<sup>+</sup> cells per dish in complete methylcellulose medium for human clonal-culture assays. Various concentrations of HbVs or empty liposomes (vol/vol %) were added to the medium containing the cells. BFU-E, CFU-GM, CFU-Mix, and CFU-C were scored after 14 days incubation. HPP-CFC was scored after 28 days incubation. Data represent the mean  $\pm$  SD of three experiments performed on three separate CB donors in (A) and (B), respectively. A two-way paired ANOVA followed by Bonferroni's test was used for comparisons of multiple HbVs-treated groups with the control (HbVs; 0%) group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus HbVs (0%).



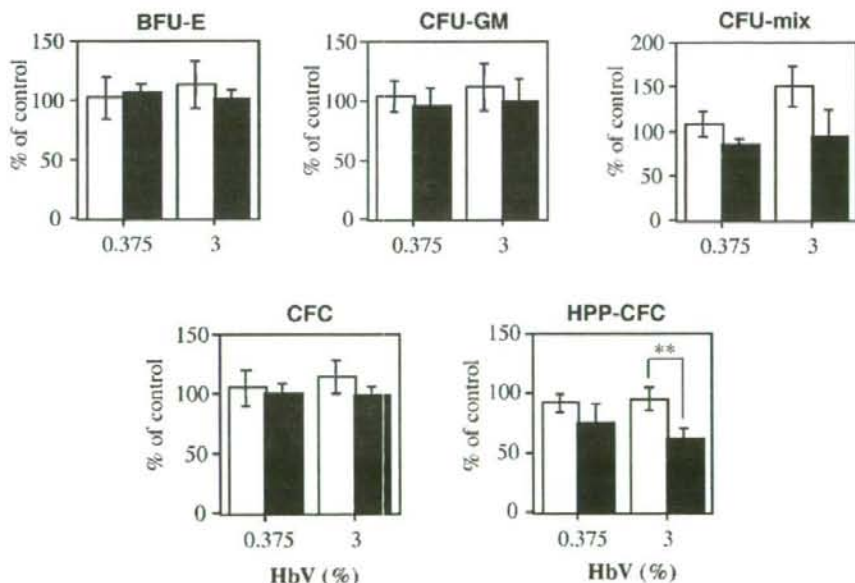
**Figure 2.** Effects of HbVs on the size of the colonies of BFU-E and CFU-GM formed in clonal cultures of CB-derived cells. Representative colonies of BFU-E and CFU-GM in the absence and presence of HbVs are shown. Scales represent 50  $\mu$ m.

other mature-committed colonies (Fig. 3). From the clinical point of view, continuous exposure of hematopoietic stem/progenitor cells to HbVs in the marrow for 14 days or 28 days is unlikely. Rather, 1–3 days exposure is more relevant to the clinical setting as described below. In this sense, short-term expo-

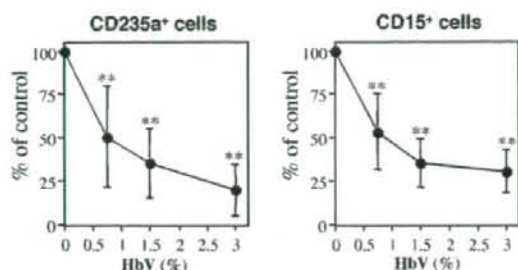
sure of hematopoietic progenitor cells to HbVs even at 3% had no adverse effect on the clonogenic activity of hematopoietic progenitor cells.

#### Proliferation and differentiation of erythroid or myeloid lineage cells from CB hematopoietic progenitor cells in liquid culture

Because the numbers of HPP-CFC and CFU-GM were significantly reduced, and the size of the colonies of BFU-E and CFU-GM tended to be smaller in the presence than in the absence of HbVs, we next examined the effect of HbVs (0.75%, 1.5%, or 3%) on the proliferation of erythroid or myeloid lineage cells in a liquid culture of CB CD34<sup>+</sup> cells. As shown in Figure 4, the presence of HbVs throughout the culture period significantly inhibited the proliferation of CD235a<sup>+</sup> cells (erythroid lineage) and CD15<sup>+</sup> (myeloid lineage) cells in a dose-dependent manner. These results suggested that continuous exposure to HbVs had an inhibitory effect on the proliferation of hematopoietic progenitor cells. Thus, the reduced number of HPP-CFC and reduced colony size of BFU-E and CFU-GM in the clonogenic assay were surmised to be associated with reduced proliferation of the erythroid and myeloid lineage cells in the presence of HbVs throughout the culture period.



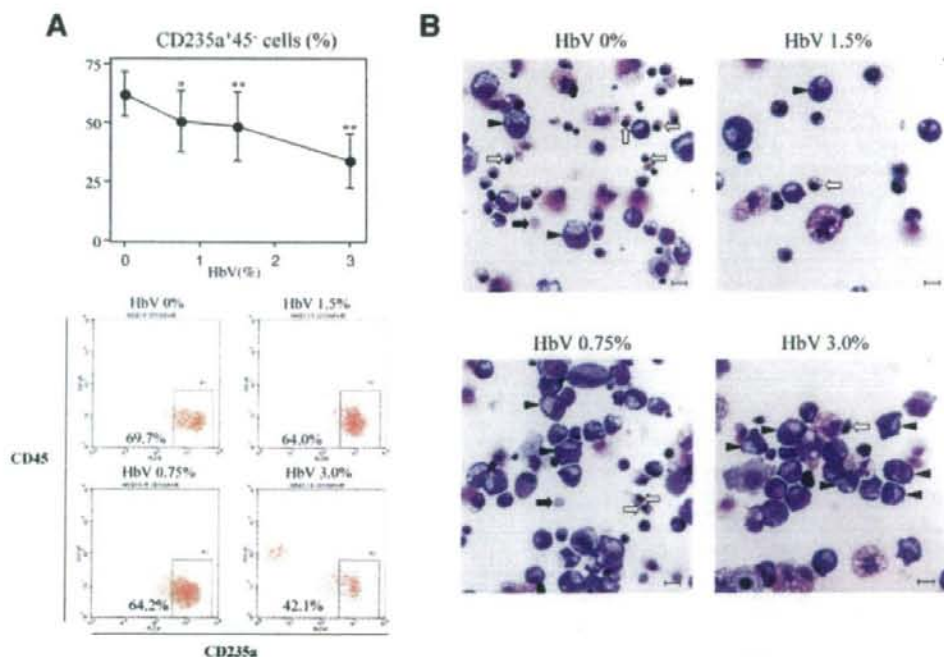
**Figure 3.** Effects of short-term exposure to HbVs on the clonogenic activity of CB-derived hematopoietic cells. CB-derived mononuclear cells were suspended in IMDM containing FCS, BSA, IL-3, SCF, G-CSF, and GM-CSF; then, different concentrations of HbVs were added to the cell suspension. The cells were incubated for 20 h (open column) or for 3 days (closed column). Subsequently, they were recovered, washed to remove the HbVs, and subjected to clonal assay. Data were expressed as the mean  $\pm$  SD of the percentage of control. Three experiments were performed on three separate CB donors. \*\* $p < 0.01$ ; 20 h versus 3-day exposure; unpaired Student's *t* test.



**Figure 4.** Effects of HbVs on the proliferation of erythroid lineage (left panel) or myeloid lineage cells (right panel) from CB-derived hematopoietic progenitor cells in liquid culture. Various concentrations of HbVs were added to medium containing the CB-derived CD34<sup>+</sup> cells. After 10 days' incubation, CD235a<sup>+</sup> cells for the erythroid lineage and CD15<sup>+</sup> cells for the myeloid lineage, respectively, were analyzed by flow cytometry. Data represent the mean  $\pm$  SD of six experiments performed on six separate CB donors. A two-way paired ANOVA followed by Bonferroni's test was used for comparisons of multiple HbVs-treated groups with the control (HbVs; 0%) group. \*\* $p < 0.01$  versus HbVs (0%).

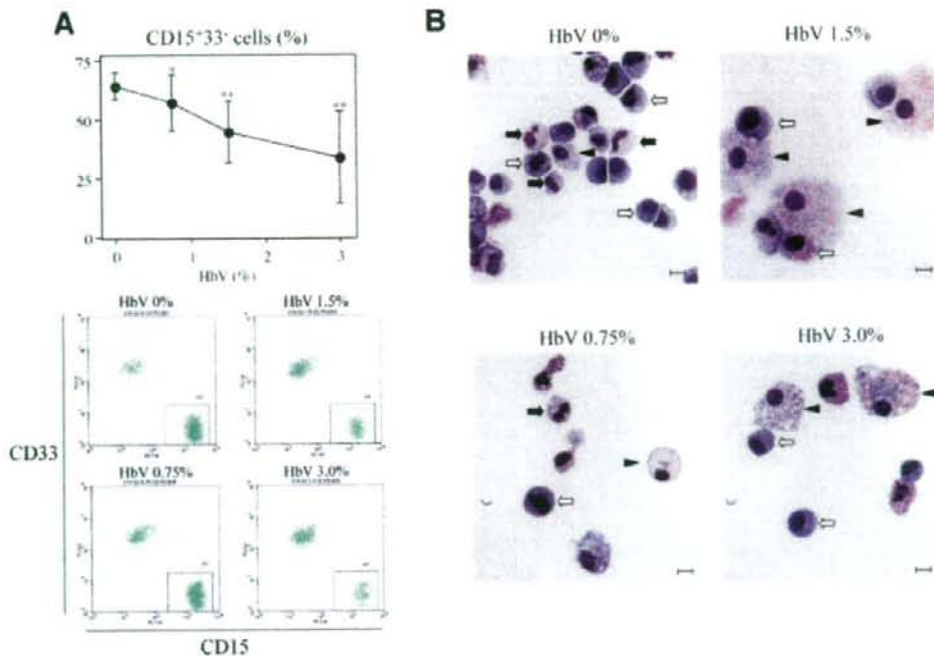
We further analyzed the subset of CD235a<sup>+</sup> cells and CD15<sup>+</sup> cells. The CD235a<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells and CD15<sup>+</sup>CD33<sup>-</sup> cells represented some of the more differentiated cells in the erythroid and myeloid lineage, respectively. Continuous exposure to HbVs significantly reduced the percentage of CD233<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells in the total cell population (Fig. 5A). Microscopic examination of a smear of cells cultured for 10 days revealed that while orthochromatic erythroblasts and erythrocytes (differentiated lineage) were present in the absence of HbVs, basophilic erythroblasts (less differentiated lineage) were more abundant in the presence of 3% HbVs (Fig. 5B).

Similarly, continuous exposure to HbVs significantly decreased the percentage of CD15<sup>+</sup>CD33<sup>-</sup> cells in the total cell population (Fig. 6A). Examination of a smear of the cells showed that while metamyelocytes (differentiated lineage) could be recognized in the absence of HbVs, myelocytes (less differentiated lineage) were more abundant in the presence of 3% HbVs (Fig. 6B). These results suggest that continuous exposure to HbVs also inhibited the



**Figure 5.** Effects of HbVs on the differentiation of erythroid cells from CB-derived hematopoietic progenitor cells in liquid culture. CB-derived CD34<sup>+</sup> cells were cultured in the medium for induction of erythroid lineage without or with HbVs (0.75%, 1.5%, or 3.0%). A: The percentage of CD235a<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells in the total cell population was analyzed by flow cytometry. Data represent the mean  $\pm$  SD of experiments performed on six separate donors. A two-way paired ANOVA followed by Bonferroni's test was used for comparisons of multiple HbVs-treated groups with the control (HbVs 0%) group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus HbVs (0%). Representative results of flow cytometric analysis are shown at the bottom. B: Morphology of the cells generated in the liquid culture for erythroid lineage. Arrow head; basophilic erythroblasts, white arrow; orthochromatic erythroblasts, and black arrow; erythrocyte. Note that the differentiated erythroid cells are much fewer in number in the presence of HbVs when compared with that in the control (HbVs 0%). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]





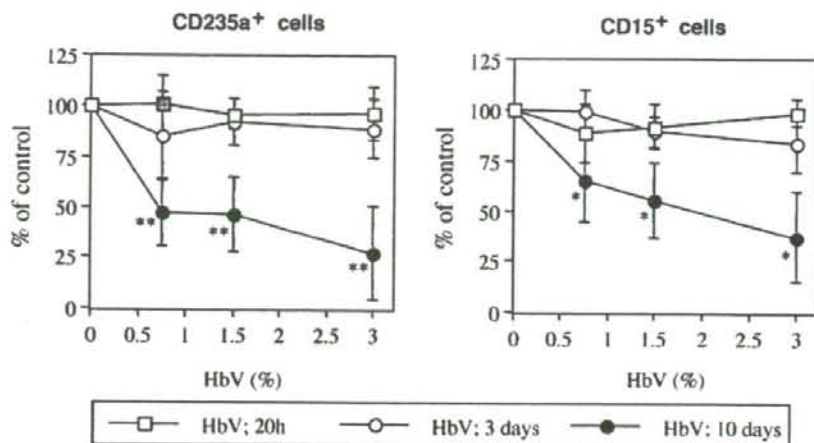
**Figure 6.** Effects of HbVs on the differentiation of myeloid cells from CB-derived hematopoietic progenitor cells in liquid culture. CB-derived CD34<sup>+</sup> cells were cultured in the medium for the induction of myeloid lineage without or with HbVs (0.75%, 1.5% or 3.0%). **A:** The percentage of CD15<sup>+</sup> CD33<sup>-</sup> cells in the total cell population was analyzed by flow cytometry. Data represent the mean  $\pm$  SD of experiments performed on six separate CB donors. A two-way paired ANOVA followed by Bonferroni's test was used for the comparisons of multiple HbVs-treated groups with the control (HbVs 0%) group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus HbVs (0%). Representative results of flow cytometric analysis are shown at the bottom. **B:** Morphology of the cells generated in the liquid culture for erythroid lineage. Arrow head, macrophage; white arrow, myelocyte; and black arrow, metamyelocyte. Note that the differentiated myeloid cells are much fewer in number in the presence of HbVs when compared with that in the control (HbVs 0%). Scales represent 10  $\mu$ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

differentiation of both erythroid and myeloid lineage cells.

Next, the effects of the short exposure to HbVs, which is more relevant to the clinical setting, of CD34<sup>+</sup> cells on the proliferative activity of both erythroid and myeloid lineage cells were examined. Exposure to HbVs even at 3% for 20 h or for 3 days did not affect the proliferative activity of either the CD235a<sup>+</sup> cells or the CD15<sup>+</sup> cells (Fig. 7). Furthermore, the percentages of CD235a<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> cells and CD15<sup>+</sup>CD33<sup>-</sup> cells in the total cell population were not affected by exposure to HbVs, either for 20 h or for 3 days (data not shown). Thus, HbVs exerted no inhibitory effects on the proliferation and differentiation of either erythroid or myeloid lineage cells following short durations of exposure.

Several hypotheses have been suggested to explain the inhibitory effects of continuous exposure to HbVs on hematopoietic progenitor activity including direct contact of the progenitor cells with HbVs, conversion of Hb in HbVs to met-Hb during culture,

interaction of progenitor cells with several components from HbVs, which might degrade over time. The observation that the empty liposomes did not have any inhibitory effect on the clonogenic activity suggested that the progenitor activity was not inhibited by direct contact of the progenitor cells with the HbVs surface, but by the presence of Hb in the HbVs. In this case, higher dissolved oxygen concentrations in the culture medium were theoretically expected in the presence of HbVs than in the absence of HbVs, which may be involved in the inhibition of progenitor activity following to the prolonged exposure to HbVs. Furthermore, conversion of Hb to met-Hb within HbVs<sup>24</sup> cannot be excluded as the reason for the inhibition of progenitor activity caused by HbVs. In addition, there is a possibility that HbVs might degrade during long-term incubation, leading to the release of Hb. We determined the Hb level during the continuous presence of HbVs in liquid culture up to 10 days. At maximum, 6.7% of the Hb in the HbVs inputted at 3% (i.e., 0.02



**Figure 7.** Effects of HbVs on the proliferation of erythroid lineage (left panels) or myeloid lineage (right panels) cells from CB-derived hematopoietic progenitor cells in liquid culture. CB-derived CD34<sup>+</sup> cells were exposed to HbVs (0%, 0.75%, 1.5%, or 3%) for 20 h, 3 days, or 10 days. After culture for a total of 10 days, CD235a<sup>+</sup> cells for the erythroid lineage and CD15<sup>+</sup> cells for the myeloid lineage, respectively, were analyzed by flow cytometry. The number of CD235a<sup>+</sup> cells or CD15<sup>+</sup> cells at each concentration of HbVs is expressed as a percentage of the number in the control (HbVs 0%). Data represent the mean  $\pm$  SD of three experiments performed on three separate CB donors. A two-way paired ANOVA followed by Bonferroni's test was used for comparisons of multiple HbVs-treated groups with the control (HbVs 0%) group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus HbVs (0%).

g/dL) was released into the culture supernatant. This Hb concentration was calculated as  $\sim 3 \mu\text{M}$ . According to the report by Fowler et al.,<sup>25</sup>  $1 \mu\text{M}$  of recombinant Hb did not affect the proliferation of erythroid or myeloid lineage cells from human bone marrow CD34<sup>+</sup> cells in liquid culture system. Therefore, we do not believe that the released Hb accounted for the inhibitory effect of long-term exposure to HbVs on the progenitor activity.

It is difficult to predict the events *in vivo* from the results of experiments *in vitro*, because the effects of HbVs on the immature hematopoietic stem/progenitor cells from the CB may not be the same as those on the hematopoietic stem/progenitor cells in the adult bone marrow. In addition, the concentration of HbVs used here is based on simple assumption and may not necessarily be relevant to the physiological conditions prevailing in humans. With regard to the exposure time to HbVs, continuous exposure of hematopoietic stem/progenitor cells to HbVs in the marrow for more than 10 days is unlikely in the clinical setting. Rather, 1–3 days exposure is more relevant to the clinical setting, because a study in which an acute 40% exchange transfusion of HbVs was administered to rats showed that a significant amount of the HbVs was phagocytosed by the macrophages in the marrow by 1–3 days after the infusion. A significant decrease in the number of HbVs was observed at 7 days, with the vesicles becoming undetectable at 14 days. Under these conditions,

hematopoietic activity, including the formation of erythroblastic islets was observed at 3 days in the marrow.<sup>14</sup> Moreover, the destination of HbVs in the bone marrow is macrophages, and the HbVs are degraded in the phagosomes. These findings imply that there is little possibility of direct contact between HbVs and the hematopoietic progenitor cells *in vivo*. The finding that short-term exposure to HbVs did not have any significant effect on the clonogenic activity or the proliferation and differentiation of erythroid and myeloid lineage cells in liquid culture is consistent with the results of animal experiments,<sup>14,15</sup> suggesting that the infusion of HbVs in humans may have no adverse effects on hematopoiesis.

In conclusion, our results suggest that HbVs, under conditions relevant to the clinical setting, have no adverse effect on human CB hematopoietic progenitor activity *in vitro*. The present results are of value for estimating the biocompatibility of HbVs and hematopoietic progenitor cells.

The authors thank Prof. Koichi Kobayashi and Dr. Hirohisa Horinouchi (School of Medicine, Keio University) for their meaningful discussions.

## References

- Djordjevic L, Miller IF. Synthetic erythrocytes from lipid encapsulated hemoglobin. *Exp Hematol* 1980;8:584–592.

2. Phillips WT, Klipper RW, Awasthi VD, Rudolph AS, Cliff R, Kwasiorski V, Goins BA. Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: A long circulating red cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:665-670.
3. Chang TM. Hemoglobin-based red blood cell substitutes. *Artif Organs* 2004;28:789-794.
4. Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, Yoshizu A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* 1997;8:23-30.
5. Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit Care Med* 2004;32:539-545.
6. Cabrales P, Sakai H, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Oxygen transport by low and normal oxygen affinity hemoglobin vesicles in extreme hemodilution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1885-H1892.
7. Yoshizu A, Izumi Y, Park S, Sakai H, Takeoka S, Horinouchi H, Ikeda E, Tsuchida E, Kobayashi K. 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* 2004;50:458-463.
8. Wakamoto S, Fujihara M, Abe H, Yamaguchi M, Azuma H, Ikeda H, Takeoka S, Tsuchida E. Effects of hemoglobin vesicles on resting and agonist-stimulated human platelets in vitro. *Artif Cells Blood Subs Biotechnol* 2005;33:101-111.
9. Ito T, Fujihara M, Abe H, Yamaguchi M, Wakamoto S, Takeoka S, Sakai H, Tsuchida E, Ikeda H, Ikebuchi K. Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced responses of polymorphonuclear neutrophils in vitro. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001;29:427-437.
10. Abe H, Fujihara M, Azuma H, Ikeda H, Ikebuchi K, Takeoka S, Tsuchida E, Harashima H. Interaction of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, with human plasma: Effects on coagulation, kallikrein-kinin, and complement systems. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2006;34:1-10.
11. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:145-160.
12. Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:702-709.
13. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 2001;159:1079-1088.
14. Sakai H, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Takaori M, Tsuchida E, Kobayashi K. Acute 40 percent exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles (HbV) suspended in recombinant human serum albumin solution: Degradation of HbV and erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks. *Transfusion* 2006;46:339-347.
15. Abe H, Azuma H, Yamaguchi M, Fujihara M, Ikeda H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E. Effects of hemoglobin vesicles, a liposomal artificial oxygen carrier, on hematological responses, complement and anaphylactic reactions in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007;35:157-172.
16. Pessina A, Malerba I, Gribaldo L. Hematotoxicity testing by cell clonogenic assay in drug development and preclinical trials. *Curr Pharm Des* 2005;11:1055-1065.
17. Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Takeoka S, Tsuchida E. Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: Objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem* 2000;11:56-64.
18. Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol Prog* 2003;19:1547-1552.
19. Sakai H, Hisamoto S, Fukutomi I, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by Limulus amoebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment of surfactant. *J Pharm Sci* 2004;93:310-321.
20. Lipton JM, Nathan DG. The anatomy and physiology of hematology. In: Nathan DG, Oski FA, editors. *Hematology of Infancy and Childhood*. Philadelphia: WB Saunders; 1987. p 128-158.
21. Ohkawara JI, Ikebuchi K, Fujihara M, Sato N, Hirayama F, Yamaguchi M, Mori KJ, Sekiguchi S. Culture system for extensive production of CD19+IgM+ cells by human cord blood CD34+ progenitors. *Leukemia* 1998;12:764-771.
22. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajzman H, Douay L. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:69-74.
23. Unverzagt KL, Bender JG, Loudovaris M, Martinson JA, Hazelton B, Weaver C. Characterization of a culture-derived CD15+CD11b- promyelocytic population from CD34+ peripheral blood cells. *J Leukoc Biol* 1997;62:480-484.
24. Teramura Y, Kanazawa H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E. Prolonged oxygen-carrying ability of hemoglobin vesicles by coencapsulation of catalase in vivo. *Bioconjugate Chem* 2003;14:1171-1176.
25. Fowler DA, Rosenthal GJ, Sommadossi JP. Effect of recombinant human hemoglobin on human bone marrow progenitor cells: protection and reversal of 3'-azido-3'-deoxythymidine-induced toxicity. *Toxicol Lett* 1996;85:55-62.

# Biocompatibility Study of Hemoglobin Vesicles, Cellular-Type Artificial Oxygen Carriers, with Human Umbilical Cord Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Using an *In Vitro* Expansion System

MIKI YAMAGUCHI,\* MITSUHIRO FUJIHARA,\* SHINOBU WAKAMOTO,\* HIROMI SAKAI,† SHINJI TAKEOKA,‡ EISHUN TSUCHIDA,† HIROFUMI HAMADA,§ HIROSHI AZUMA,\* AND HISAMI IKEDA\*

Hemoglobin vesicles (HbVs), liposomal oxygen carriers containing human hemoglobin, are candidates for development of a clinically useful transfusion alternative. Our previous *in vivo* animal studies of massive HbV dosages demonstrated the lack of any suppressive effect on hematopoiesis. Before starting clinical trials, we aimed to examine the details of the biocompatibility of HbVs with human hematopoietic stem/progenitor cells. We investigated the effect of HbVs at a concentration of up to 3 vol/vol (%) on expansion of human umbilical cord (CB) hematopoietic stem/progenitor cells, using a coculture system of human TERT-transfected bone marrow stromal cells and CD34<sup>+</sup> cells *in vitro*. The exposure of CB CD34<sup>+</sup> cells to HbVs up to 14 days suppressed the expansion of total cells and the CD34<sup>+</sup> cells themselves, whereas the empty liposomes, that did not contain Hb, had modestly inhibitory effects on the expansion of these cells. As a result, the number of colonies obtained from the expanded CD34<sup>+</sup> cells was inhibited by the exposure to HbVs. In contrast, exposure to HbVs for 3 days had no effect on the expansion of CD34<sup>+</sup> cells and only slightly decreased the number of total cells. Our *in vitro* experimental condition does not fully recreate the physiological condition, and the effect of the direct contact of HbV would be magnified because of the absence of shielding by the vasculature and the lack of the reticuloendothelial system and blood stream. However, the present data raise some concern regarding hematopoiesis, and one has to pay attention to this in future human clinical trials. *ASAIO Journal* 2009; 55:000–000.

Hemoglobin vesicles (HbVs) or liposome-encapsulated Hbs comprise human hemoglobin encapsulated with a phospholipid bilayer membrane and have been developed as an arti-

ficial oxygen carrier.<sup>1–3</sup> Hemoglobin vesicles are promising candidates for clinically useful transfusion alternatives, because several lines of evidence have demonstrated that HbVs transport oxygen as efficiently as red blood cells.<sup>4–7</sup> The distribution study using infusion of technetium-99m-labeled HbVs in animals demonstrated that the HbVs were mainly distributed in the liver, spleen, and bone marrow.<sup>8</sup> Because bone marrow is the major site of hematopoiesis, there has been concern whether the HbVs which have accumulated in the bone marrow might adversely affect hematopoiesis.

Hematopoietic stem cells (HSCs) are generally defined as cells having the self-renewing potential and the capacity to give rise to differentiated cells of all hematopoietic lineages.<sup>9</sup> Colony-forming assays, as *in vitro* models of hematopoiesis, have been widely used to investigate the proliferation and differentiation of both pluripotent HSCs and of the different progenitor cells of blood cell lineages, and were utilized for screening for the safety of the compound in preclinical testing.<sup>10,11</sup> In addition, liquid culture system in a certain combination of hematopoietic cytokines allows hematopoietic progenitor cells to proliferate to single lineage cells such as erythroid and myeloid cells.<sup>12,13</sup> Using these systems, we have recently investigated the influence of HbVs on *in vitro* hematopoiesis of human hematopoietic progenitor cells obtained from umbilical cord blood (CB), and have demonstrated that longer exposure of CB progenitor cells to HbVs negatively affected progenitor activity, whereas such an effect was minimal under shorter exposure to HbVs.<sup>14</sup>

However, the expansion of HSCs in culture while maintaining their functions has been extensively carried out.<sup>15–17</sup> Because contact between HSCs and stromal cells in bone marrow is important for maintaining the function of HSCs, several methods that support expansion of HSCs and progenitor cells derived from human bone marrow or CB using cocultures with primary stromal cells have been reported.<sup>18–20</sup> Our group also achieved the expansion of hematopoietic stem/progenitor cells from CB using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human bone marrow stromal cells.<sup>21</sup> In the study, we also demonstrated that the expanded CD34<sup>+</sup> cells contained transplantable stem cells through a transplantation experiment using nonobese/severe combined immunodeficiency mice.<sup>21</sup> Thus, in the present study, we sought to evaluate whether HbVs had any adverse

From the \*Japanese Red Cross, Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo; †Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku; ‡Consolidated Research Institute for Advanced Science and Medical Care, Waseda University, Tokyo, Japan; and §Department of Molecular Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan.

Submitted for consideration March 2008; accepted for publication in revised form November 2008.

Reprints Requests: Mitsuhiro Fujihara, PhD, Hokkaido Red Cross Blood Center, Yamanote, Nishi-ku, Sapporo 063-0002, Japan. Email: fujihara@hokkaido.bc.jrc.or.jp.

DOI: 10.1097/MAT.0b013e318198e550