

oxygen infusions.

8. US Patent 7,417,118: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier

9. European Patent 1,466,649: Pharmaceutical

composition containing artificial oxygen carrier

10. PCT/JP2012/59233 (2012年4月4日出願): 小胞体の製造法.

## 分担課題：ヘモグロビン小胞体 (HbV) の体内動態特性に関する検討

主任研究者 小田切 優樹 崇城大学薬学部  
熊本大学

教授  
名誉教授

## 研究要旨

本研究では、カニクイザルにヘモグロビン小胞体 (HbV) を単回大量投与し、血漿中濃度推移について評価を行った。4匹のカニクイザルにHbVを1400 mg Hb/kgで投与したところ、投与終了後12時間までは細網内皮系細胞の飽和に起因すると考えられる消失の飽和が確認された。その後、1-コンパートメントで消失し、消失層での半減期は約60時間であった。さらに、投与後14日目には、血漿中HbVは検出されなかったことから、投与後14日までに、HbVは血中から完全に消失していることが示唆された。さらに、動物実験における体内動態結果から経験的にヒトまで外挿する方法の一つであるアロメトリック式を用い、今回のサルにおける体内動態結果に加え、これまでに明らかとなっているマウス・ラット・ウサギの体内動態結果よりヒトへの外挿を試みた。その結果、ヒトにおける半減期は約160時間と予測され、HbVのヒトでの半減期は約5～6日程度であると予測された。今回得られた知見は、HbVのヒトにおける安全性の予測に有用になるだけでなく、臨床試験の際のプロトコール作成の重要な基盤情報になると考えられる。

## A. 研究目的

医薬品を開発する過程の中で、前臨床段階として製剤化試験、薬理試験、薬物動態試験、さらには毒性試験など多くの段階を経て、その有効性と安全性を確立していく必要がある。細胞型人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体 (HbV) は様々な*in vitro*試験に加え、マウス、ラット、ウサギ、ビーグル犬、ミニブタなどを用いた*in vivo*試験において物理化学的特性や有効性及び安全性が証明されている。HbVの臨床試験への移行を想定した場合、齧歯類や中型動物における前臨床評価に加え、ヒトと同じ霊長類であるサルを用いた評価も重要であると考えられる。その主な理由として、霊長類における安全性試験結果は、ヒトに投与後の安全性の予測に

有用になるだけでなく、臨床試験を遂行する際のプロトコール作成の重要な基盤情報になる、ことが挙げられる。そこで本研究では、4匹の雄性カニクイザルにHbVを1400 mg Hb/kgで単回投与し、HbV投与14日後までの血中滞留性について観察を行った。さらに、カニクイザルの体内動態結果に、これまでに明らかになっているマウス、ラット、ウサギの体内動態結果を加え、動物実験における結果を経験的にヒトまで外挿する方法であるアロメトリック式を用い、HbVのヒトにおける半減期を予測した。

## B. 研究方法

### 1. 動物

実験動物はカニクイザル（オス、4～8才、5.57～5.93 kg）を用いた。実験開始前10日間を馴化期間とし、飼育環境・投与及び採血条件に慣れさせた。12時間の明暗サイクルで飼育し、固形飼料を約108 g/day及びトリーツを2回/週で与え、水は自動給水装置を用い自由摂取させた。

### 2. 倫理面への配慮

動物実験は、科学研究の一般原則に従い、動物の生命を尊重するという基本的観点に基づく動物福祉を護持するための配慮を念頭に置き、株式会社新日本科学 安全研究所の動物実験委員会により承認を受け、実験を施行した。

### 3. HbVの投与

カニクイザルを保定器に拘束し、ディスポーザブル注射筒、留置針、延長チューブ及びインフュージョンポンプを用い、無麻酔下で前腕橈側皮静脈に1400 mg Hb/kgの投与量でHbV溶液（遺伝子組み換え型ヒト血清アルブミンを5%含有）を1 mL/minで投与した。

### 4. 体内動態

HbV投与前、投与直後、投与終了後10, 30分、1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 168, 336時間に大腿静脈からヘパリンナトリウム加注射筒を用い採血した。直ちに遠心処理を行い、血漿を得た。

得られた血漿中のヘモグロビン濃度をシアンメトヘモグロビン法（ヘモグロビン B テストワコー）により測定し、血中濃度推移を評価した。

### 5. ヒトへの外挿

動物実験における体内動態結果を経験的にヒトまで外挿する方法の一つであるアロメトリック式を用い、ヒト（70 kg）におけるHbVの半減期を算出した。アロメトリック式はクリアラン

スが体重のべき乗に比例するという経験則に基づいており、以下の式で表される。

$$P = \alpha \cdot W^\beta$$

P: 分布容積 (Vdss) またはクリアランス (CL)

W: 体重 (kg)

$\alpha$ : アロメトリック係数

$\beta$ : アロメトリック指数

マウス・ラット・ウサギの体内動態結果は以下の論文より引用した。

Taguchi K et al. *J Control Release*. (2009) 136:232-9.

Sou K et al. *J Pharmacol Exp Ther*. (2005) 312:702-9.

## C. 結果および考察

### 1. 体内動態

HbVを含む血液を遠心分離処理するとHbVは血漿分画に残存するため、HbVと赤血球の分離は容易に行うことが可能である。そこで、HbVの血中動態を検討するために血漿中ヘモグロビン濃度をシアノメトヘモグロビン法で測定することで、HbVの血中動態を評価した。その結果、すべてのカニクイザルにおいて投与終了後12時間までは一定の血中濃度を示し、細網内皮系細胞の飽和に起因すると考えられる一過性の消失の飽和現象が確認された (Figure 1, inset)。しかしながら、投与終了12時間以降では、1-コンパートメントで消失し、消失層での半減期は約60時間と算出された (Figure 1)。

また、投与後14日目には、血漿中HbVはシアノメトヘモグロビン法で検出できず、目視上においても血漿中にHbVは確認されなかったことから、投与後14日目までには、HbVは完全に分解され、血中から消失している可能性が示唆された (Figure 2)。これらの結果より、HbVは霊長類（カニクイザル）においても十分な血中滞留性を有

し、また、1400 mg Hb/kgと大量単回投与しても投与後14日目には血中より完全に消失していると考えられ、血中蓄積性はないことが確認された。

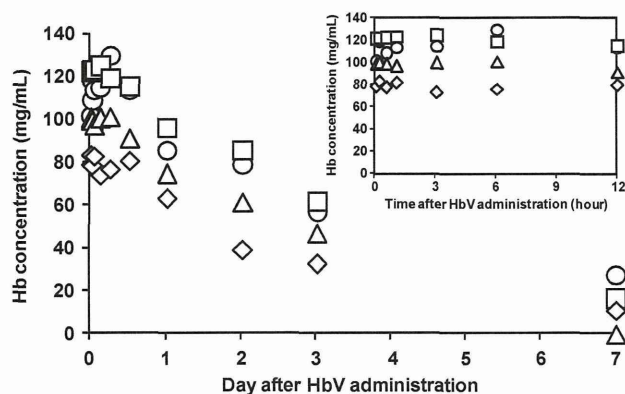


Figure 1

Time course for plasma concentration of hemoglobin represents HbV concentration in plasma after HbV administration at a dose of 1400 mg Hb/kg in cynomolgus monkeys.

The individual values are representing as following symbols (○; No.1, □; No.2, △; No.3, ◇; No.4).

## 2. アニマルスケールアップ

HbVのヒトにおける体内動態の予測はHbVのヒトにおける安全性、有効性を予測する上で有用であると考えられる。そこで、数種類の動物における体内動態実験結果を経験的にヒトまで外挿する方法であるアロメトリック式を用い、HbVのヒトでの半減期の算出を試みた。常法に従い、マウス、ラット、ウサギ、カニクイザルの結果よりヒト (70 kg) における分布容積、クリアランスを予測した (Figure 3)。Figure 3で算出した分布容積、クリアランスよりHbVの半減期を算出したところ、約160時間と予測された。これらの結果より、HbVのヒトでの半減期は約5~6日程度であると予測された。



Pre-injection Immediate 14 days

Figure 2 The appearance of plasma before HbV administration (left), immediately after finishing administration (middle) and 14 days after HbV administration (right).

## D. 結論

カニクイザルに対し、HbVを1400 mg Hb/kgで単回大量投与した場合、HbVの霊長類での血中動態特性は齧歯類では見られなかった消失の飽和現象が投与後12時間まで認められた。これは、カニクイザルへの投与時間が齧歯類と比べ、非常に長かったため、投与中にHbVの消失経路である細網内皮細胞が飽和したためと考えられる。しかしながら、投与後12時間以降より消失が始まり、投与14日後には血中より消失が確認されており、血中蓄積性はなかった。さらに、今回データを示していないが、血清生化学検査において脂質関係のパラメーター (リン脂質・トリグリセリド・総コレステロール・HDL-コレステロール) の経時的な上昇が確認された。この結果は、HbVが代謝される際におこる上昇であると推測され、HbVが霊長類においても十分に代謝され、生体蓄積性を示さないことを裏付けるデータと考えられる。

以上より、HbVを霊長類へ投与した今回のケースでは、HbVは霊長類においても十分な血中滞留性を保持していると考えられるとともに、生体

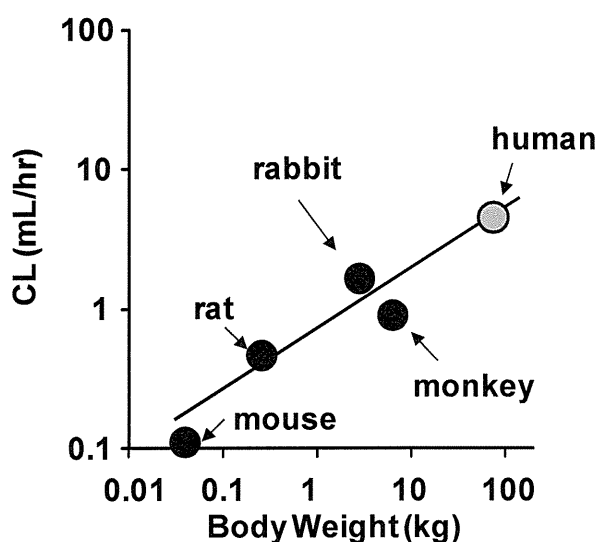
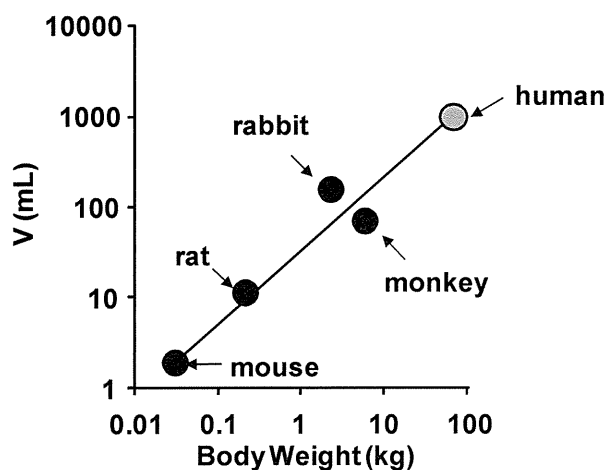


Figure 3 Allometric relationships between body weight and distribution volume (Vdss) and body

clearance (CL). The graph shows V (mL) on a log scale (1 to 10000) versus Body Weight (kg) on a log scale (0.01 to 100). Data points for mouse, rat, rabbit, monkey, and human are plotted, showing a positive linear relationship on the log-log scale.

蓄積性はないことが示唆された。これらの知見は、HbVのヒトにおける安全性の予測に有用になるだけでなく、臨床試験の際のプロトコール作成の重要な基盤情報になると考えられる。しかしながら、以前、我々は健常ラットと大量出血モデルラット (40%脱血時) においてHbVの体内動態が異なる (Taguchi K et al. *J Control Release*. (2009) 136:232-9.) そのため、ヒトにおいても大量出血時では今回の予測と若干の違いがある可能性は否定できないと考えられる。さらに、HbVの体内動態は脱血量の違いによっても異

なることも考えられる。現在、30-50% 出血性ショックモデルラットにおけるHbVの体内動態 ( $^{125}\text{I}$ -HbVを使用) を検討することで脱血量の違いによるHbVの体内動態の変化を明らかにすることができると考え、予備試験を遂行している。これらの結果と今回得られたヒトにおける予測を総合的に評価することで、今後、健常人におけるHbVの体内動態の予測に加え、大量出血患者におけるHbVの体内動態の予測が可能になると考えられる。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究業績

##### 1. 主な論文発表

- Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, **Otagiri M**, Maruyama T. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin. *Nitric Oxide*. (2013) *in press*
- Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, **Otagiri M**. Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta*. (2013) 1830:2917-23.
- Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney*

*Int.* (2013) *in press*

4. Nishi K, Kobayashi M, Nishii R, Shikano N, Takamura N, Kuga N, Yamasaki K, Nagamachi S, Tamura S, **Otagiri M**, Kawai K. Pharmacokinetic Alteration of (99m)Tc-MAG3 using Serum Protein Binding Displacement Method. *Nucl Med Biol.* (2013) *in press*
5. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. *Kidney Int.* (2013) *in press*
6. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, **Otagiri M**, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome P450 impairment in hemorrhagic-shock rats. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41:141-8.
7. Kadowaki D, Sumikawa S, Arimizu K, Taguchi K, Kitamura K, Ishitsuka Y, Narita Y, Irie T, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**, Hirata S. Effect of acetaminophen on the progression of renal damage in adenine induced renal failure model rats. *Life Sci.* (2012) 91:1304-8.
- 8 Taguchi K, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, **Otagiri M**. A Fourteen-Day Observation and Pharmacokinetic Evaluation after a Massive Intravenous Infusion of Hemoglobin- Vesicles (Artificial Oxygen Carriers) in Cynomolgus Monkeys. *J Drug Metab Toxicol.*, (2012) 3, 1000128
9. Ishima Y, Hara M, Kragh-Hansen U, Inoue A, Suenaga A, Kai T, Watanabe H, **Otagiri M**, Maruyama T. Elucidation of the therapeutic enhancer mechanism of poly-S-nitrosated human serum albumin against multidrug-resistant tumor in animal models. *J Control Release.* (2012) 164:1-7.
10. Watanabe K, Ishima Y, Akaike T, Sawa T, Kuroda T, Ogawa W, Watanabe H, Suenaga A, Kai T, **Otagiri M**, Maruyama T. S-nitrosated  $\alpha$ -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J.* (2013) 27:391-8.
11. Kaga M, Li H, Ohta H, Taguchi K, Ogaki S, Izumi H, Inagaki M, Tsuchiya S, Okamura K, **Otagiri M**, Sakai H, Yaegashi N. Liposome-encapsulated hemoglobin (hemoglobin-vesicle) is not transferred from mother to fetus at the late stage of pregnancy in the rat model. *Life Sci.* (2012) 91:420-8.
12. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Chuang VT, Sato K, **Otagiri M**, Maruyama T. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate. *Biochem Pharmacol.* (2012) 84:1207-14.
13. Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kodama A, Maeda H, Watanabe K, Kai H, **Otagiri M**, Maruyama T.  $\alpha$ (1)-Acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 protein pathway: possible protection against hemolysis-induced oxidative stress. *J Biol Chem.* (2012) 287:30688-700.

14. Kaneko K, Chuang VT, Ito T, Suenaga A, Watanabe H, Maruyama T, **Otagiri M**. Arginine 485 of human serum albumin interacts with the benzophenone moiety of ketoprofen in the binding pocket of subdomain III A and III B. *Pharmazie*. (2012) 67:414-8.
15. Taguchi K, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**. Pharmaceutical aspects of the recombinant human serum albumin dimer: structural characteristics, biological properties, and medical applications. *J Pharm Sci*. (2012) 101:3033-46.
16. Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Miyamura S, Ishima Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. *Drug Metab Dispos*. (2012) 40:1423-8.
17. Ishima Y, Hoshino H, Shinagawa T, Watanabe K, Akaike T, Sawa T, Kragh-Hansen U, Kai T, Watanabe H, Maruyama T, **Otagiri M**. S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J Pharm Sci*. (2012) 101:3222-9.
18. Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. *IUBMB Life*. (2012) 64:450-4.
19. Komori H, Nishi K, Uehara N, Watanabe H, Shuto T, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**. Characterization of hepatic cellular uptake of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP), part 2: involvement of hemoglobin  $\beta$ -chain on plasma membranes in the uptake of human AGP by liver parenchymal cells. *J Pharm Sci*. (2012) 101:1607-15.
20. Ishima Y, Chen D, Fang J, Maeda H, Minomo A, Kragh-Hansen U, Kai T, Maruyama T, **Otagiri M**. S-Nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects. *Bioconjug Chem*. (2012) 23:264-71.
21. Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajou K, Misumi S, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**. Characterization of the hepatic cellular uptake of  $\alpha$ (1) -acid glycoprotein (AGP), part 1: a peptide moiety of human AGP is recognized by the hemoglobin  $\beta$ -chain on mouse liver parenchymal cells. *J Pharm Sci*. (2012) 101:1599-606.

## 2. 主な学会発表

(主な国際発表)

- Hiroshi Watanabe, Daisuke Honda, Yohei Miyamoto, Tsuyoshi Noguchi, Daisuke Kadowaki, Yu Ishima, Motoko Tanaka, Hisae Tanaka, Masafumi Fukagawa, **Masaki Otagiri**, and Toru Maruyama. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the activation of NADPH oxidase. (49th ERA-EDTA Congress, Paris 2012. 2012/5/24-27)
- Yohei Miyamoto, Yasunori Iwao, Katsumi Mera, Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki, Yu Ishima, Victor Tuan Giam Chuang, Keizo Sato, **Masaki**

**Otagiri** and Toru Maruyama\*. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate accumulates in proximal tubular cells and induces cell damage through increasing oxidative stress. (49th ERA-EDTA Congress, Paris 2012. 2012/5/24-27)

3. **Masaki Otagiri**, Yu Ishima, Toru Maruyama, VTG Chuang. Human serum albumin as a nanomedicine carrier. (Nanof ormulation 2012. 2012/5/28-6/1)

4. **Masaki Otagiri**. The potential of albumin for use as a nanomedicine carrier. (Montreal 2012 international forum on environment and medicine. 2012/7/24-25)

(主な国内発表)

1. 井上 亜希, 異島 優, 方 軍, 前田 浩, **小田切 優樹**, 渡邊 博志, 丸山 徹. S -ニトロソ化アルブミンダイマーはEPR効果を増強する (日本薬剤学会第27年会 2012/5/24-26)
2. 濱崎 慶輔, 渡邊 博志, 弥永 直樹, 國安 明彦, 異島 優, **小田切 優樹**, 丸山 徹. アルギニンペプチドを利用した細胞膜透過型アルブミンの設計と評価 (日本薬剤学会第27年会 2012/5/24-26)
3. 弥永 直樹, 渡邊 博志, 濱崎 慶輔, 國安 明彦, 異島 優, **小田切 優樹**, 丸山 徹. In vivo フェージディスプレイ法を用いた新規腎送達ペプチドの探索 (日本薬剤学会第27年会 2012/5/24-26)
4. 渡辺 佳織, 異島 優, 赤池 孝章, 澤智裕, 黒田 照夫, 小川 和加野, 渡邊 博志, 甲斐 俊哉, **小田切 優樹**, 丸山 徹. S-ニトロソ化に伴う

$\alpha$ 1-酸性糖タンパク質 (AGP) の抗菌機能獲得と感染症治療への応用 (第12回日本NO学会学術集会 2012/6/29-30)

5. 異島 優, 品川 拓也, 米重 梓二, 甲斐 俊哉, 赤池 孝章, **小田切 優樹**, 丸山 徹. S-ニトロソ化アルブミンにより抗アポトーシス効果を付与した改良型臓器保存液の開発 (第12回日本NO学会学術集会 2012/6/29-30)
6. **小田切 優樹**, 蓑毛 藍, 異島 優, 成底 徹, 諏訪 喜昭, 渡邊 博志, 森岡 弘志, 丸山 徹. ヒト血清アルブミンドメインIIによるビリルビン尿中排泄促進作用 (第28回日本DDS学会学術集会 2012/7/4-5)
7. 大柿 滋, 田口 和明, 渡邊 博志, 丸山 徹, **小田切 優樹**. 出血性ショックも出るラットにおける一酸化炭素付加型赤血球の肝地とクロームP450保護効果 (第19回日本血液代替物学会年次大会 2012/10/25-26)
8. 南雲 恒平, 杉森 剛志, 山田 尚之, 久保田和幸, 渡邊 博志, 異島 優, 田中 元彦, 佐々木 裕, 丸山 徹, **小田切 優樹**. ESI-TOF/MSを用いたシステイン付加型ヒト血清アルブミンの検出と機能相関—慢性肝疾患の影響— (第19回日本血液代替物学会年次大会 2012/10/25-26)
9. 田口 和明, 酒井 宏水, 堀之内 宏久, 小林 紘一, 丸山 徹, **小田切 優樹**. 細胞型人工酸素運搬体—ヘモグロビン小胞体のカニクイザルへの大量投与の結果からみた実効性 (第19回日本血液代替物学会年次大会 2012/10/25-26)
10. 丸山 徹, 田口 和明, 氏平 隼人, 渡邊 博志,



新井 愛美, 池田 康夫, 武岡 真司, 半田 誠,  
小田切 優樹. 血小板代替物 H12 (ADP)  
リポソームの体内動態に及ぼす血小板減少症  
の影響 (第19回日本血液代替物学会年次大会  
2012/10/25-26)

11. 太田 英伸, 李 コウ, 加賀麻衣子, 田口 和  
明, 大柿 滋, 泉 仁美, 稲垣 真澄, 土屋 滋,  
岡村 洲博, 小田切 優樹, 酒井 宏水, 八重樫  
伸生. ラット妊娠母体におけるヘモグロビン  
小胞体の胎盤通過性 (第19回日本血液代替物  
学会年次大会 2012/10/25-26)

12. 渡辺 佳織, 異島 優, 赤池 孝章, 澤智裕, 黒  
田 照夫, 小川 和加野, 渡邊 博志, 甲斐 俊哉,  
小田切 優樹, 丸山 徹. S-ニトロソ化に伴う  
 $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質 (AGP) の抗菌機能獲得  
と感染症治療への応用 (第34回生体膜と薬物  
の相互作用シンポジウム 2012/11/15-16)

13. 宮本 洋平, 渡邊 博志, 本田 大輔, 門脇 大  
介, 異島 優, 深川 雅史, 小田切 優樹, 丸山  
徹. 尿毒症物質p-クレジル硫酸のレドックス  
特性と腎障害、心血管疾患発症機序解明 (第  
34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム  
2012/11/15-16)

14. 大柿 滋, 田口 和明, 前田 仁志, 異島 優,  
渡邊 博志, 小田切 優樹, 丸山 徹. 一酸化  
炭素付加赤血球によるクッパー細胞の不活化  
は輸血誘発肝チトクロームP450機能障害を保  
護する (第34回生体膜と薬物の相互作用シン  
ポジウム 2012/11/15-16)

**G. 知的財産権の出願。登録状況 (予定を含  
む)**

特になし

## 分担課題：1) ヘモグロビン小胞体(HbV)が免疫系に与える影響の

### 容量依存性の検討と抑制効果軽減の試み

## 2) ヘモグロビン小胞体(HbV)製剤の開発におけるプリオンについての考え方

分担研究者	東 寛	旭川医科大学小児科 教授
研究協力者	藤原 満博	北海道赤十字血液センター 製剤開発課
	酒井 宏水	早稲田大学 重点領域研究機構・上級研究員（研究院教授）

## 研究要旨

1) 循環血液量の20% v/vに相当するポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン小胞体(HbV)あるいはHb分子を内包しない空リポソーム(DPPC-liposome)をラットに投与後、摘出した脾細胞では、一過性のT細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現にはNOの産生が関与していることを見いだした。この事を背景として、本研究では、投与するリポソームの容量とT細胞増殖抑制効果発現の関係およびリポソームにNO産生に関与する物質(Arginine あるいはL-NMMA)をあらかじめ内包したリポソームで、抑制効果の減弱が可能か否かを検討した。リポソーム投与後のT細胞増殖抑制効果は、循環血液量の5%の投与量で20%投与量とほぼ同等であった。2%投与量では、有意差はなかったが抑制される傾向が認められた。一方、iNOS inhibitorであるL-NMMAを内包したDPPC-liposomeを投与するとT細胞の増殖抑制効果が軽減する傾向がみられた。また、iNOSの基質であるarginineを内包したDPPC-liposomeは、用いた実験条件下では、T細胞増殖抑制効果の若干の増強効果が認められたのみであった。2) HbVがヒト由来ヘモグロビンを原料として用いているので、プリオン対策についても本研究班において考えておく必要がある。バイオ医薬品としての安全性を論じるにあたり、我が国における血液製剤のプリオン対策を参考にすることが現実的であろうと考えられる。

## 1) ヘモグロビン小胞体(HbV)が免疫系に与える影響の容量依存性の検討と抑制効果軽減の試み

### A. 研究目的

我々はこれまでラットの免疫系へのHbVの影響を検討するため、HbV投与後に脾臓を摘出し、脾細胞のex vivoでの培養系において非特異的マイトジェンConAや特異抗原Keyhole limpet hemocyaninに

対する反応性の変化を検討してきた。その結果、HbVおよびHbVを内包しない空リポソームの投与で、一過性にこれらの増殖刺激に対する反応性が低下すること、そしてこの低下にNOの産生が関与することを既に見出している。しかし、投与するリポソーム溶液の容量とT細胞増殖抑制効果に関しては詳細な検討がなされていなかった。本研究は、この点を明らかにすること、およびT細胞増殖抑制効果を誘導しないための試みを検討することを目

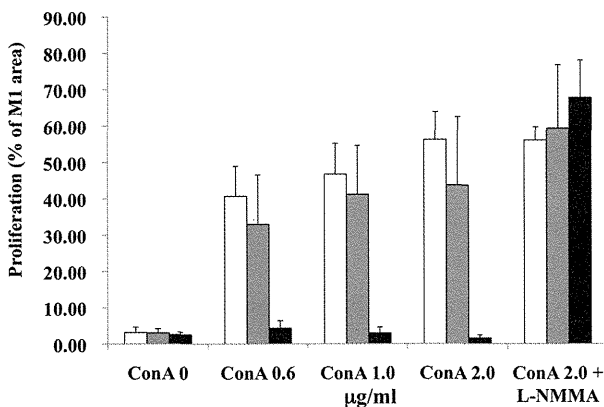
的とした。

## B. 研究方法

### 1. 空リポソーム投与ラットからの脾細胞の調整

実験には WKAH ラット, ♂, 8-11 週齢, 体重約 200-300 g を用いた。ラットに循環血液量の 5%, 2% (v/v)に相当する Hb 分子を内包していない空リポソーム(DPPC-liposome) (脂質含量として約 6g/dl)をエーテル麻酔下、尾静脈より輸注した。コントロール群には同量の saline を輸注した。

Hb 分子を内包しない空のリポソームをラットに輸注後およそ 16 時間後にエーテル麻酔にて犠牲死し、無菌的に脾臓を摘出した。培養液(RPMI-1640/10%FCS/50 $\mu$ l 2-mercaptoethanol (2-ME)) 5 mL に浸した脾臓をディッシュ中ですりつぶし、その懸濁液を遠心チューブに移して静置することにより、大きな組織塊を沈降させた。上清を 2,000 rpm $\times$ 5 min 遠心し、沈殿した細胞を RPMI1640 で洗浄した後、塩化アンモニウム-トリス緩衝液 (IBL 免疫生物研究所) 5 mL にて 5-7 分間溶血処理をした。溶血処理細胞液に培養液を加え、遠心・洗浄後、培養液に再懸濁して脾細胞とした。



**Fig. 1A** dose response inhibitory effect on T cell proliferation Empty liposome (□:2% (v/v), ■: 5%(v/v); □: saline) was infused into rat. Then, splenocytes were incubated in the presence of Con A at indicated concentrations. Infusion of 5%(v/v) of liposome into rat was enough to induce the inhibition of rat splenic T cell proliferation. Even 2%(v/v) of liposome was enough to induce the tendency of inhibition. The concentration of L-NMMA added in the culture was 2mM. Results from one of two independent experiments was shown. Both experiments showed the same results. Bars represent S. D.

### 2. CFSE法による Con A 刺激に対するラット脾 T 細胞の増殖反応の検討

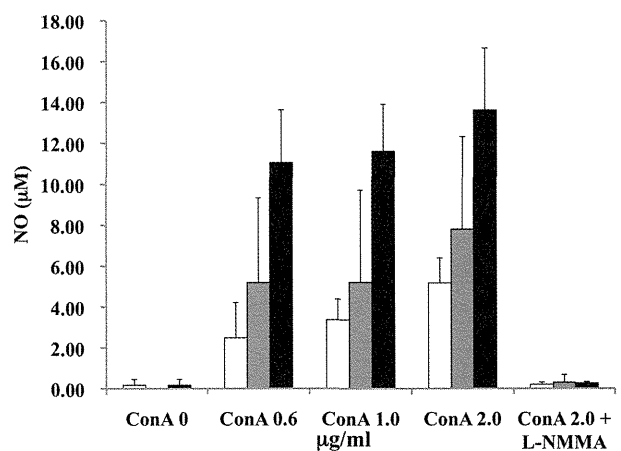
1. で得られた脾細胞を PBS/1%FCS にて 2 回洗浄後、 $1 \times 10^7$ /mL に調整し、5 $\mu$ M Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE: Molecular Probes) を加え、37 °C にて 5 分間細胞を染色した。培養液で洗浄後、24 穴平底プレートに duplicate または triplicate で分注 ( $8 \times 10^5$  個/1mL/ウェル) し、Concanavalin A (ConA; Sigma-Aldrich) を加え 37 °C、5% CO<sub>2</sub> にて培養した。培養 72 時間後に細胞を回収しフローサイトメトリーにて、CFSE で染色された細胞のパターンを解析した。分裂した結果として蛍光の減弱している領域 (M1 領域) の全体に占める割合を細胞増殖の指標とした。

### 3. Nitric Oxide (NO) の測定

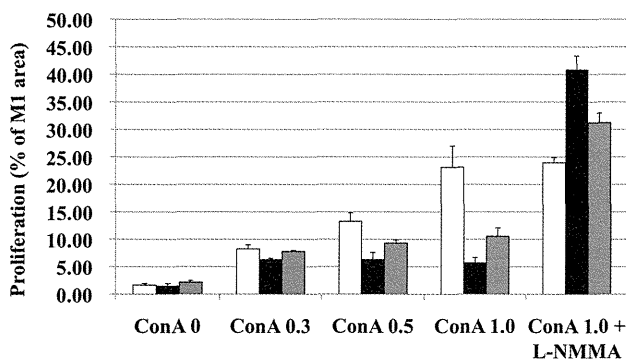
ConA 存在下で 3 日間培養した上清を回収し、その上清中の NO レベルを Griess Assay Kit (R & D Systems) によって測定した。

### 4. L-NMMA (iNOS 阻害薬) あるいは arginine 内包リポソームの脾臓 T 細胞増殖反応への影響

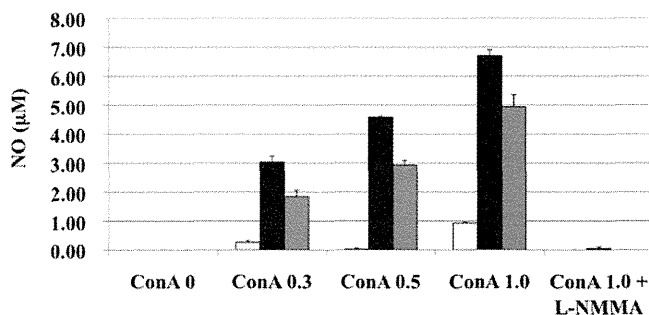
Inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor (2mM; L-NMMA; Alexis Corp., San Diego, CA) ある



**Fig. 1B** dose response inhibitory effect on NO production Experimental condition was the same as that described in the legend in Fig. 1A. Infusion of 2% (v/v) of empty liposome into rat was enough to inhibit NO production from rat splenic cells stimulated by Con A. The concentration of L-NMMA added in the culture was 2mM. Results from one of two independent experiments was shown. Both experiments showed the same results. Bars represent S. D.



**Fig. 2A Reduced inhibition of T cell proliferation by L-NMMA-liposome** 20%(v/v) of empty liposome (■), arginine-liposome (▒) or saline (□) was injected into rats. Then, splenocytes were incubated in the presence of Con A at indicated concentrations. The concentration of L-NMMA added in the culture was 2mM. The L-NMMA-Liposome tended to lift the inhibition of splenic T cell proliferation induced by empty liposome. Results from one of two independent experiments was shown. Both experiments showed the same results. Bars represent S. D.



**Fig. 2B Reduced production of NO by L-NMMA-liposome** Experimental condition was the same as described in the legend of Fig 3A. The concentration of L-NMMA added in the culture was ??????. The NO production of L-NMMA-liposome loaded splenocytes (▒) was lower than that of empty liposome loaded splenocytes (■) (P<0.05????). Results from one of two independent experiments was shown. Both experiments showed the same results.

いは $N^G$ -monomethyl-L-arginine の10 mMの溶液を作成したのち、それぞれを内包させたりポソーム溶液を作成して、循環血液量の20%(v/v)の容量を投与し、そのT細胞増殖抑制効果およびNO産生に与える影響を、空リポソームの影響と比較検討した。また、脾細胞培養液に加えたL-NMMAは最終濃度が2 mMとなるように調整した。

## C. 研究結果

### 1. T細胞増殖抑制効果発現と投与するリポソームの容量依存性について

あらかじめCFSEで脾細胞を染色して、Con A刺激による増殖反応をフローサイトメータで観察した。一回以上分裂している細胞全体を示す領域(M1領域)内にある細胞数の全細胞数に占める割合を増殖の指標とし、% of M1 areaで表した (Fig. 1A)。既に20%(v/v)のリポソーム投与で、T細胞の増殖抑制効果が観察されることは明らかなので、2%、5%の投与量を設定して実験を行った。その結果、5%の投与量で明らかな抑制効果が認められた。2%投与量でも生食投与との有意差はないが、増殖が抑制される傾向が観察された。

NOの産生も同時に検討した。その結果2%、5%はいずれも生食投与と比較してNO産生量が増加していることが確認された(Fig. 1B)。また、L-NMMA (2 mM)存在下ではNOの産生がほぼ完全に抑制さ

れており、この条件下で増殖抑制が完全に解除されていること(Fig. 1A)と矛盾しない結果となった。

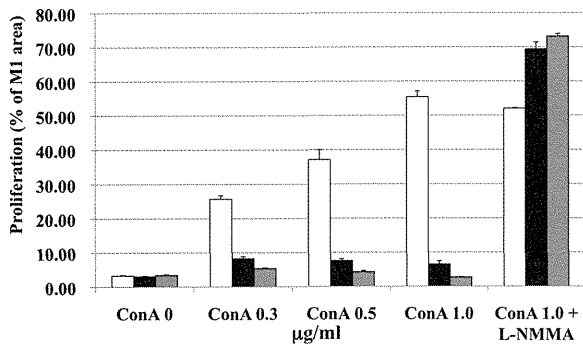
### 2. iNOS阻害薬あるいはarginine内包リポソームのT細胞増殖抑制効果について

これまでの検討でNOの産生がT細胞の増殖抑制に深く関与していることが明らかになっていることから、あらかじめリポソームにNO産生に必要なinducible NO synthase (iNOS)のinhibitorであるL-NMMAをあらかじめリポソームに内包しておくことで、抑制誘導効果を軽減できるかどうかを検討した (Fig. 2A)。L-NMMA内包リポソームによるT細胞増殖抑制効果は、空リポソームと比較すると減弱されている傾向が認められた。NO産生量についても抑制抑制が認められた(Fig. 2B)。

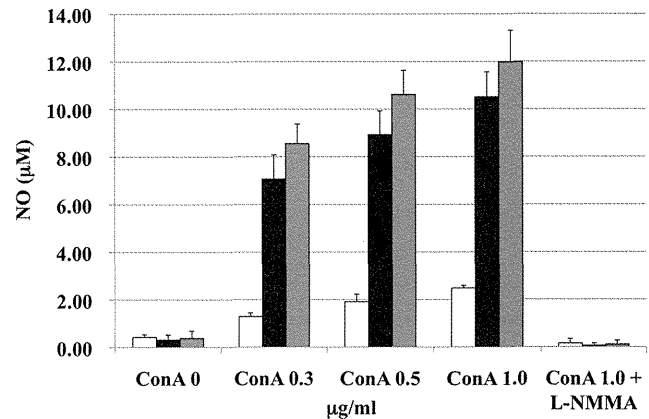
NOはarginineを基質としてiNOSにより産生されるのであらかじめarginineを内包したりポソームが免疫抑制効果を増強する可能性も検討した(Fig. 3A, 3B)。Arginine内包リポソームは空リポソームと比較してわずかに増殖抑制効果が増強しており、それを裏付けるようにNOの産生量も空リポソームより高い傾向があった。

## D. 考察

ラットの免疫系への空リポソーム投与の影響を、摘出脾細胞のex vivoでの培養系において非特異的



**Fig. 3A Inhibition of T cell proliferation by arginine-liposome**  
20%(v/v) of empty liposome (■), arginine-liposome (▣) or saline (□) was injected into rats. Then, splenocytes were incubated in the presence of Con A at indicated concentrations. The concentration of L-NMMA added in the culture was 2mM. The empty liposome induced significant inhibition of splenic T cell proliferation compared to saline. Arginine-liposome also induced inhibition no less than the empty liposome. Results from one of two independent experiments was shown. Both experiments showed the same results. Bars represent S. D.



**Fig. 3B Enhanced production of NO by arginine-liposome**  
The experimental condition was the same as described in the legend in Fig 3A. Arginine-liposome (▣) treated splenocytes tended to produce more NO than empty liposome (■). The concentration of L-NMMA added in the culture was 2mM. Results from one of two independent experiments was shown. Both experiments showed the same results. Bars represent S. D.

マイトジェン ConA や特異抗原 Keyhole limpet hemocyanin に対する反応性で評価をおこなってきた。その結果、HbV を構成する Hb を包埋していない空リポソーム (DPPC-liposome) の投与のみで、一過性にこれらの刺激に対する反応性が低下すること、そしてこの低下に NO が関与することを既に見出している。しかし、いままでの一連の実験に用いた HbV 溶液やリポソーム溶液の投与量は、ラット循環血液量の 20%(v/v) であった。そこで、リポソームの投与量と投与後に観察される T 細胞増殖抑制効果の関係を調べる必要があった。今回の得られた結果では、投与量がわずか 5% (v/v) であっても顕著な T 細胞増殖抑制効果が認められ、2%(V/V) でも有意差はないが抑制傾向が認められるという結果であった。体重 50kg のヒトの循環血液量をおおよそ 3500 ml と計算すると、その 2% はわずか 70ml となる。今、輸血が必要な局面が、少なくとも出血量 400 ml 以上であるとすれば、血液代替物としておおよそ 400 ml の HbV 溶液を輸血すると仮定できる。従って、HbV 溶液の輸注により、一時的な T 細胞増殖抑制効果を誘導する可能性があるかと推量できる。一方、この事はわずか 2%(v/v) の量で軽度ながらも T 細胞増殖抑制効果が誘導されることを意味しており、リポソームの新たな応用面を考える上でも重要な結果と考えられよう。

HbV を生体に大量に投与することによる、T 細胞増殖抑制誘導効果を軽減することが理想である。既に *ex vivo* の実験系では iNOS inhibitor である L-NMMA の存在下では、抑制効果が解除されることを見いだしているのだから、あらかじめ L-NMMA をリポソームに内包しておけば、抑制効果を減弱できるのではないかと考え、その可能性を検討した。今回の検討では、濃度が 10mM の L-NMMA 溶液を内包したリポソームを作成し、その抑制効果を空リポソームと比較した。L-NMMA を内包させると、抑制効果 (および NO 産生量) の軽減効果を認めたが、顕著なものではなかった。しかしながら、内包させる L-NMMA の増量することで、より明確な効果の可能性があるともあり、今後の検討を要するものと判断している。

Arginine は iNOS が NO を産生するための基質であるため、その補充は NO の産生量を増量させ、抑制効果を増強する可能性がある。しかし一方で、arginine の枯渇を防ぎ、細胞増殖に有利に作用する可能性もある。今回の検討では、arginine 内包リポソームは空リポソームと比較すると T 細胞増殖抑制効果と NO の産生量をわずかながら増強する傾向が観られた。しかし、投与したリポソームは今まで通り、循環血液量の 20% (v/v) であることから、リポソーム投与量の少ない実験条件下 (投与量が

2~5% (v/v)での検討が必要と考えられる。

## E. 結論

ラットにHbV(あるいは空リポソーム)溶液を循環血液量の20% (v/v)相当の量を投与した後に、一過性に認められるT細胞増殖抑制効果は循環血液量の5%の投与でも顕著に認められ、2%でもその傾向が認められた。この効果はあらかじめiNOS inhibitorを内包しておくことで、微弱ながら軽減できる可能性がある。

## 2) ヘモグロビン小胞体(HbV)製剤の開発におけるプリオンについての考え方

### A. 研究目的

HbVがヒトhemoglobinを材料としていることから、そのバイオ医薬品としての安全性を論じるにあたり、プリオンの混入の可能性とその対処法について予め考えて置く必要がある。本研究では、我が国における血液製剤のプリオン対策の現状を考察し、今後の人工赤血球製剤の研究開発方針に反映させることを目的としている。

### B. 研究結果

#### (現状調査)

#### A) 英国に於ける状況

1986年に英国でBSE:狂牛病(Mad Cow Disease)が流行していることが報告された。この原因が、当時牛の飼料として使用されていた肉骨粉に、羊のTransmissible Spongiform Encephalopathy (TSE)であるスクレイピーの原因物質が混入していたことが原因と指摘され、英国では家畜飼料から肉骨粉を排除した。その結果、狂牛病の発生は1992をpeakとして減少してきた。しかし、その4年後の1996年に若年性のCJDの発生が同じく英国で報告され、

それがBSEを発症した牛由来の組織の混入した食品(MRM; mechanically recovered meat)の摂取によるものであることがほぼ確実となりMRMが禁止された。

vCJDの発症者数は2000年の英国の28人をピークに年々減少してきている。また牛の特定臓器(SBO:specified bovine offal, 脳、脊髄、脾臓、胸腺、扁桃、腸)内食品への使用が禁止された1989年以降に生まれたvCJDの患者は確認されておらず、英国に端を発したvCJDの蔓延は防ぎ得た可能性が示唆されている。(GA Mackay et al., The molecular epidemiology of variant CJD. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2011; 217:181-)

#### B) 我が国におけるBSEおよび vCJD発生状況

2001年9月に国内で初めてのBSE発生が確認されてから、2009年1月に36等目が確認され、国内牛では、それが最後となっている。2009年5月には、日本は「BSEがリスク管理されている国」(準清浄国)として国際獣疫事務局(OIE)から認定された。輸入牛肉に関しても、年齢制限と特定危険部位の除去および全頭検査(それが有効性を論じることは避けるが)を実施しており外部から狂牛病感染肉が食物連鎖に入る可能性は極めて低い。

vCJDの国内発生に関しては、2004年にvCJD患者が1名発生したが、英国渡航歴を有していることから国内での感染例ではないと考えられている。即ち事実上、国内でのvCJD発生は報告されていない。

#### C) vCJDの輸血による感染例について

vCJDが血液を介して感染するか否かは、輸血の世界でも重大な問題として捉えられ、英国において、慎重な調査が行われてきた。その結果、現在までに献血後にvCJDと診断されたドナー由来の血液の輸血を受けた受血者4名がvCJDに感染していることが報告されており、異常プリオンが混入した血液製剤によりvCJDに感染する可能のあることが明

らかにされている。従って、我が国に於ける輸血によるvCJD感染の予測をすることには意味がある。1)1990年20代の前半の患者が存在し、2)輸血歴や海外渡航歴の有る人の献血制限がなく、3) 汚染血液の輸血で必ず発症し、4) 輸血による潜伏期間は食事のものと同じという条件で、感染者発生数予測をした場合に、2010年代の前半以降には新たな発症はなく、vCJDを発生する累積患者は0.563となったと報告されている(2)。すなわち、現実には患者発生数は零と考えてよい。

一方、日赤で、実際に行われているvCJD対策は以下の二つである。即ち、1) 問診の強化 および 2) Universal Leukoreductionの導入である。以下に簡単に説明を加える。

#### 1) 問診の強化について

献血液の採血を実施する日赤の水際での対処として、献血前に問診において狂牛病が発生した国での滞在期間が長期にわたることが判明した場合には献血を断る方針を取っていた。特に1980年から1996年の間の英国滞在歴が僅か1日でも献血を断るという徹底した対応をとっていた。また我が国の献血基準ではもともと輸血歴のある人の献血は制限していた。

#### 2) Universal Leukoreductionの導入について

プリオン蛋白は主として細胞膜に存在していることから、血液製剤から白血球除去を行えば感染性プリオンの低減が期待される(3)。従って、白血球除去を全製剤で行うこと(Universal leukoreduction)により、vCJD感染に関してより高い安全性の担保が計られると考えられる。実際、Universal leukoreductionの導入に伴って、平成22年1月27日(2010/1/27)より、国は、1980年から1996年の間の英国滞在歴に関する献血制限を「1日以上」から「通算1ヶ月以上」へと大幅に緩和した。

この二つの措置を講じている現状は、上記のvCJD

の感染予測の条件よりさらに厳しいことになる。従って、現時点では、日本に於ける輸血によるvCJD感染リスクは0.563より低値であることは間違いなく、限りなく零に近いと考えられる。このことは、即ち、HbVに包埋するHb分子の原料として、期限切れヒト由来赤血球を用いている範囲では、異常プリオンが混入する可能も限りなく零に近いと考えて差し支えないことを意味する。

#### D) プリオン除去行程の導入について

白血球除去以外のプリオン除去法が存在する。すなわち、血漿分画製剤の製造工程に導入されているプリオン除去法があるので、これをヘモグロビン精製工程に導入すれば、理論的にはさらに安全性を上乗せすることが可能である(4)。しかしながら、cost-benefitを考えると、果たしてその工程が必須であるか否かは議論の余地があると思われる。一方で、いかなる操作を加えようとも、献血液を原料として使用する限りは、HbVは特定生物由来製剤であると見なされることから、溯及調査の出来る体制は整える必要があると考える。

#### C. 結 論

当研究班としては、我が国に於ける献血液由来の白血球除去済みの赤血球を原料としている限り、1) その中にvCJDの原因である異常プリオンの混入の可能性を危惧する必然性は極めて少なく、献血液に勝るとも劣らない安全性が担保されている、2) 実際のヘモグロビン精製過程に既知のプリオン除去工程を導入することもできるので更なる安全性の向上を期待できる、と考えている。

即ち、特性生物由来製品とみなされるHbVは、vCJD感染予防に関しての十分な安全性を保証することができると考えている。

#### 参考文献

- 1) GA Mackay et al. The molecular epidemiology of variant CJD. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2011;

- 2) 薬事・食品衛生審議会 平成21年度第3回血液事業部会運営委員会資料「英国渡航に由来するvCJD感染リスクの評価と献血制限のあり方について」. 梯正之. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-8o.pdf>
- 3) Yunoki M, Urayama T, Ikuta K. Possible removal of prion agents from blood products during the manufacturing process. *Future Virol* 2006; 1: 659-674.
- 4) 柚木、萩原、生田. バイオ医薬品におけるプリオンの問題 - ヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題-. *人工血液* 18, 142-150 (2010)

#### D. 健康危険情報

該当なし

#### E. 研究業績

(著書)

1. H. Azuma, M. Fujihara. Biocompatibility of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, on blood cells and plasma proteins in vitro and in vivo. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). (in press).

(学会発表)

1. 藤原満博、東寛、池田久實、酒井宏水、堀之内宏久、高本滋 / 空リポソームの投与による *ex vivo*でのラット脾臓T細胞の増殖抑制における細胞周期調節タンパクの関与 / 第19回日本血液代替物学会年次大会 / 旭川大雪クリスタルホール / 2012.10.25-26.

#### G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

該当なし



## 別添 5

表 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
原著論文			
Effect of the cellular-type artificial oxygen carrier Hb-vesicle as a resuscitative fluid for pre-hospital treatment: Experiments in a rat uncontrolled hemorrhagic shock model. <i>Shock</i> 38, 153-158 (2012)	2012年8月	Lippincott Williams & Wilkins	Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, K. Kobayashi.
Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier. <i>Current Drug Discovery Technol.</i> 9, 166-172 (2012)	2012年9月	Bentham Science	A.G. Tsai, M. Intaglietta, H. Sakai, E. Delpy, C.D. la Rochelle, M. Rousselot, F. Zal.
Cardiopulmonary hemodynamic responses to the small injection of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs. <i>J. Biomed. Mater. Res. A</i> , 100A, 2668-2677 (2012)	2012年10月	Wiley	H. Sakai, Y. Suzuki, K. Sou, M. Kano.
Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusion for 7 days in Pregnant rats and fetuses. <i>Life Sci.</i> 91, 420-428 (2012)	2012年10月	Elsevier	M. Kaga, H. Ohta, Y. Lee, R. Kamii, H. Yamamoto, S. Akiyama, S. Watanabe, T. Matsuda, Y. Kimura, S. Tsuchiya, H. Tei, L. Okamura, H. Sakai, N. Yaegashi.
Fourteen-days observation and pharmacokinetic evaluation after massive intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in cynomolgus monkeys. <i>J. Drug Metab. Toxicol.</i> 3, 1000128 (2012)	2012年10月	OMICS group	K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Maruyama, M. Otagiri.
Swine hemoglobin as a potential source of artificial oxygen carriers, hemoglobin-vesicles. <i>Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.</i> 41, 37-41 (2013)	2013年1月	Informa Healthcare	H. Sakai, K. Ng, B. Li, N. Sugimura.
総説			
Cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics. <i>Current Drug Discovery Technol.</i> 9, 188-193 (2012)	2012年9月	Bentham Science	H. Sakai.
Protein-protein interactions in solution and their interplay with protein specific functions. <i>J. Phys. Soc. Jpn</i> 81 (suppl.), SA002-1 – SA-002-11 (2012)	2012年9月	Physical Society of Japan	T. Sato, T. Fukasawa, T. Komatsu, H. Sakai, S. Ishiwata.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
Biocompatibility of a highly concentrated fluid of Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. In: Selective Topics in Nanomedicine (T.M.S. Chang ed.) World Scientific, Singapore (submitted, on 8th Nov., 2011)	印刷中	World Scientific, Singapore	H. Sakai.
Cellular-type hemoglobin-based oxygen carriers to mimic the red blood cells structure. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) (Berlin/ Heidelberg, Germany). (in press).	印刷中	Springer-Verlag	H. Sakai.
Cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier as a resuscitative fluid for hemorrhagic shock: acute and long-term safety evaluation using beagle dogs. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) (Berlin/ Heidelberg, Germany). (in press).	印刷中	Springer-Verlag	T. Ikeda, H. Horinouchi, Y. Izumi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi.
Biocompatibility of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, on blood cells and plasma proteins in vitro and in vivo. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) (Berlin/ Heidelberg, Germany). (in press).	印刷中	Springer-Verlag	H. Azuma, M. Fujihara

#### 報道など

1. NHK Eテレ「サイエンスZERO」人工赤血球の研究を紹介 (2012年7月15日)
2. J-CASTニュースに紹介記事。「早大グループが「人工赤血球」を開発 大学見本市で発表」(2012年10月19日)
3. 日本経済新聞 朝刊に紹介記事。「知の明日を築く、アジア発、生命科学研究」(2012年12月6日)

研究成果の刊行物・別冊

(2012. 4. - 2013. 3.)



## EFFECT OF THE CELLULAR-TYPE ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER HEMOGLOBIN VESICLE AS A RESUSCITATIVE FLUID FOR PREHOSPITAL TREATMENT: EXPERIMENTS IN A RAT UNCONTROLLED HEMORRHAGIC SHOCK MODEL

Yasuhisa Seishi,\* Hirohisa Horinouchi,<sup>†</sup> Hiromi Sakai,<sup>‡</sup> and Koichi Kobayashi<sup>†</sup>

\*Centre for Integrated Medical Research and <sup>†</sup>Department of General Thoracic Surgery, School of Medicine, Keio University; and <sup>‡</sup>Advanced Research Institute of Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan

Received 26 Feb 2012; first review completed 15 Mar 2012; accepted in final form 17 Apr 2012

**ABSTRACT**—The hemoglobin vesicle (Hb-vesicle) is a cellular-type artificial oxygen carrier showing a resuscitative effect comparable to that of blood transfusion in several animal models. However, the efficacy of Hb-vesicles for resuscitation when the hemorrhage cannot be controlled remains unclear. Therefore, we used Hb-vesicles in a rat hemorrhagic shock model caused by continuous bleeding. For inducing uncontrolled hemorrhage, animals were heparinized and bled from the caudal artery. Fluid resuscitation was subsequently performed with five materials: Hb-vesicle suspension in a 5% albumin (Alb) solution (HbV), washed red blood cells (wRBC) in a 6% hydroxyethyl starch (HES) solution, 5% Alb, 6% HES, and saline (Sal). During the experiment, all animals in the HbV and wRBC groups survived, whereas all those in the Alb and HES groups died. In the Sal group, five of seven animals died. In the HbV and wRBC groups, the heart rate, mean arterial pressure, and blood lactic acid levels were stabilized during resuscitation. Meanwhile, the hematocrit levels of the HbV, Alb, and HES groups showed sharp decreases (HbV:  $6.8\% \pm 1.7\%$ , Alb:  $6.8\% \pm 0.8\%$ , HES:  $5.5\% \pm 0.7\%$  at 100% total circulated blood volume; final hematocrit of the HbV group:  $1.5\% \pm 0.5\%$ ). These results suggest that shocked animals can survive longer when the Hb-vesicle supply is maintained and that HbV showed a similar effect to wRBC in maintaining the circulating volume and oxygen metabolism. Continuous infusion of Hb-vesicles may extend the survival of trauma victims with uncontrolled hemorrhage until they have reached a trauma center.

**KEYWORDS**—Liposome, caudal artery, continuous bleeding, transport, hospital

### INTRODUCTION

Many recent studies on resuscitation have focused on early coagulation therapy. In particular, damage control resuscitation has dramatically altered the initial care of severely injured soldiers requiring massive transfusion at combat support hospitals (1). In early coagulation therapy, blood components (packed red blood cells [RBCs], fresh frozen plasma, and platelets) are transfused to severely injured patients. However, these components represent an infective risk and require proper storage methods. In addition, the RBCs must be matched to a recipient of the same blood type. In the frontline of major disaster sites and the battlefield, a doctor may not be able to use proper equipment or medicine until the patients are transferred to the trauma center. Therefore, developing medical technologies that provide patients with sufficient time to reach proper facilities during transport is of critical importance. A particularly challenging problem during transport is the uncontrolled hemorrhage, despite the use of hemostatic agents and tourniquet to control it.

Hemoglobin vesicle (Hb-vesicle) is a cellular-type artificial oxygen carrier produced by encapsulating purified concentrated Hb solution in a liposome, which consists of phospholipids, cholesterol, negatively charged lipids, and polyethylene glycol (2, 3). The Hb-vesicle particles are suspended in saline (Sal), with the concentrations of Hb and lipid adjusted to 10 and 6.8 g/dL, respectively. This suspension is subsequently deoxygenated for storage in vials. Because the particle diameter is controlled to about 250 nm, the vesicle does not leak from blood vascular walls. Once the Hb-vesicles are administered intravenously, the particles disperse in the plasma and pass easily through the capillaries.

To date, many studies on hemorrhagic shock have used various animal models that simulate patients of traumatic injury and perioperative events. Moreover, various experimental models of uncontrolled hemorrhagic shock are used to study fluid resuscitation, including the massive splenic injury model (4, 5), the liver injury model (6, 7), the tail amputation model (8–12), and the blood vascular injury model (13, 14). These models show remarkable differences in the effects produced by each resuscitation method. For instance, the findings of some reports have suggested that large vessel hemorrhage models may not apply to parenchymal viscus injury (6, 7). However, those models are used mainly to assess traditional resuscitative fluids, with the volume of RBCs remaining sufficient in the blood vessels. Therefore, the total hemorrhage volume of these studies may not be insufficient to assess the ability of an oxygen carrier to enable resuscitation.

Our group previously reported several studies using a controlled hemorrhagic shock model and an exchange transfusion

Address reprint requests to Yasuhisa Seishi, B.Agr. 2S8 Research Park, Center for Integrated Medical Research, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan. E-mail: seishiya@a6.keio.jp.

This work was supported by Health and Labour Sciences Research Grants (Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices, H21-SEISAKUSOUYAKU-Ippan-006), Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan.

H.H. is a principal investigator on a grant (Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices, H21-SEISAKUSOUYAKU-Ippan-006) from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan. H.H. also is funded by Nipro Co to study artificial oxygen carriers.

DOI: 10.1097/SHK.0b013e31825ad7cf

Copyright © 2012 by the Shock Society