

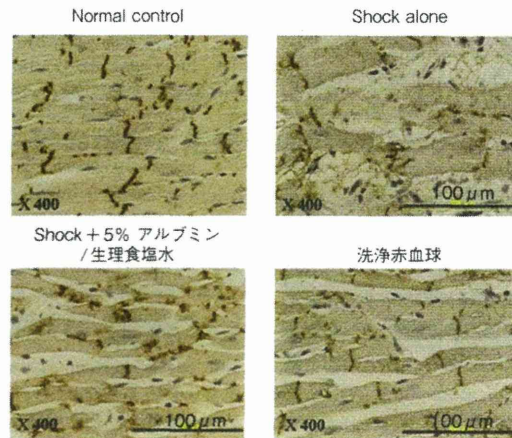


図7 左心室心筋における connexin43 発現所見

理食塩水群では著明に延長していることが認められた(図6)。

致死性不整脈の誘発性の検討では、正常ラットの摘出心臓では通常不整脈が誘発されない両心室へのburst pacing(図4A)にて、5%アルブミン群および生理食塩水蘇生群の全ラットで致死性心室性不整脈(心室細動・心室頻拍)が容易に誘発された(図4C, D)。しかし、洗浄赤血球群蘇生群ラットでは、正常ラットと同様に致死性不整脈は誘発されなかった(図4E)。

2) 心筋における connexin43 の発現(免疫組織学的検討)

左心室における connexin43 の発現を免疫組織学的に検討した。図7に示したように、視覚的定性的に connexin43 発現量・発現様式の異常の有無を検討した。その結果、正常ラットの左心室心筋における connexin43 の正常な発現量・発現様式と比較し、5%アルブミン群および生理食塩水群では明らかに connexin43 の発現量・発現様式は異常であり、洗浄赤血球群では正常に保たれていた。

3 考 察

今回の実験研究では、“出血性ショック心臓”

において、洗浄赤血球蘇生が致死性不整脈誘発の抑制効果があり、その機序として心筋興奮伝播時間と伝播様式・APDの均一性・心筋gap junctionの伝導蛋白 connexin43等を正常に保つ作用が貢献している可能性があることが示唆された。

本研究では、非蘇生群の全ラットが死亡する致死性再出血による出血性ショックモデル(30%脱血)を用いた、いわゆる“出血性ショック心臓”において、通常臨床現場で用いられる5%アルブミン蘇生群、生理食塩水蘇生群および洗浄赤血球蘇生群における、致死性不整脈の誘発頻度やその機序を、摘出心臓に対する optical mapping system と burst pacing による致死性不整脈誘発法で検討した。その結果、5%アルブミン群および生理食塩水群では血行動態は正常に復し、蘇生に成功したものの、摘出心臓における optical mapping system では興奮伝播異常・再分極不均一性を示す APD dispersion の増加が認められ、かつ、不整脈の発生機序に係る心筋 gap junction の伝導蛋白 connexin43 の発現低下が認められるとともに、致死性不整脈の誘発の頻度が増加していた。これらの異常変化は、洗浄赤血球蘇生群では認められなかつ

た。

これまでの報告では、急性出血性ショックに伴い、侵襲の大きさに伴った心筋障害が惹起され、出血性ショック早期の死亡率に関与しているとされている^{4, 7, 8)}。これらの心筋障害には、血流の低下および貧血による心筋虚血そのものの影響に加え、“出血性ショック心臓”に固有の2次的血流障害や代謝異常が関与する可能性を示唆する報告もある^{5, 9, 10)}。したがって、“出血性ショック心臓”では、単に5%アルブミンや生理食塩水による蘇生では、その回復は不十分と考えられる。洗浄赤血球治療群で、致死性不整脈やその病因となるoptical mapping system解析指標、心筋gap junctionの伝導蛋白connexin43の発現は保たれた。このことは、出血性ショック治療において、血行動態の改善のみならず、貧血を改善することにより“出血性ショック心臓”の心筋組織に十分な酸素供給を行うことが重要と考えられる。

本研究を、臨床現場における“出血性ショック心臓”の治療に直結させるには十分とはいえないものの、出血性ショック後に遷延する血行動態の不安定性や心不全・致死性不整脈の発生予防に、十分な酸素運搬作用が治療上重要であることを示唆する結果と考えられた。

文 献

- 1) Rubin LJ. Introduction: Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guideline. *Chest* 2004;126:7S-10S.
- 2) Kuriyama T. Clinical aspect of precapillary pulmonary hypertension, *Nihon Kyobu Sikkan Gakkai Zasshi (Jpn Respir Disease)* 1992;30:3-11.
- 3) Umar S, Lee JH, da Lange E, Iorga A, Partow-Navid R, Bapat A, et al. Spontaneous ventricular fibrillation in right ventricular failure secondary to chronic pulmonary hypertension. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5:181-90.
- 4) Koura T, Hara M, Takeuchi S, Ota K, Okada Y, Miyoshi S, et al. Anisotropic conduction properties in canine atria analyzed by high-resolution optical mapping: preferential direction of conduction block changes from longitudinal to transverse with increasing age. *Circulation* 2002;105:2092-8.
- 5) Miyazaki K, Hori S, Inoue S, Adachi T, Bessho M, Kuwahira I, et al. Characterization of energy metabolism and blood flow distribution in myocardial ischemia in hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1997;273:H600-7.
- 6) Sasano C, Honjo H, Takagishi Y, Uzzaman M, Emdad L, Shimizu A, et al. Internalization and dephosphorylation of connexin43 in hypertrophied right ventricles of rats with pulmonary hypertension. *Circ J* 2007;71:382-9.
- 7) Nagami Y, Kinoshita M, Takase B, Ogata Y, Saitoh D, Kikuchi M, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin transfusion rescues rats undergoing progressive hemodilution from lethal organ hypoxia without scavenging nitric oxide. *Ann Surg* 2008;248:310-92.
- 8) Shono S, Kinoshita M, Takase B, Nogami Y, Kaneda S, Ishihara M, et al. Intraosseous transfusion with liposome-encapsulated hemoglobin improves mouse survival after hypohemoglobinemic shock without scavenging nitric oxide. *Shock* 2011;35:45-52.
- 9) Adachi T, Hori S, Miyazaki K, Nakagawa M, Inoue S, Ohnishi Y, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates myocardial ischemia in hemorrhagic shock in constant pressure model. *Shock* 1998;9:204-9.
- 10) Nakagawa M, Hori S, Adachi T, Miyazaki K, Inoue S, Suzuki M, et al. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels prevent extension of myocardial ischemia to subepicardium during hemorrhagic shock. *Shock* 2008;30:178-83.

輸血代替としての人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の 安全性試験

Safety Evaluation of Artificial Red Cells (Hemoglobin-Vesicles) as a Transfusion Alternative

酒井 宏水^{(1),(2)}, 堀之内 宏久^{(3),(4)}, 東 寛⁽⁵⁾, 小田切 優樹⁽⁶⁾, 小林 紘一⁽³⁾

Hiromi Sakai^{(1),(2)}, Hirohisa Horinouchi^{(3),(4)}, Hiroshi Azuma⁽⁵⁾, Masaki Otagiri⁽⁶⁾, Koichi Kobayashi⁽³⁾

和文抄録

輸血代替の創製を目的として開発されて来た人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤は、血液と同等の濃厚な微粒子分散液である（ヘモグロビン濃度 10 g/dL, 粒子占有体積 40% 程度）。高純度高濃度ヘモグロビンをカプセル化することにより、ヘモグロビンの副作用を完全に遮断出来る。我々は 1997 年より厚生労働科学研究として本製剤の製造法、有効性と安全性について検討して来た。出血性ショック蘇生液としての利用や、体外循環回路補填液としての有効性などを動物投与試験から明らかにしている。更に、製剤の特性（小粒子径、酸素親和度の調整、比較的高い粘性、CO 結合性）を活かし、輸血では対応の出来ない疾患や治療（がん、虚血性疾患、再灌流傷害、臓器保存）など、新しい臨床応用の可能性も実証してきた。他方、人工赤血球製剤の安全性については、投与量が一人当たり数リットル以上になることもあり得るので、生体に対する影響を動物投与試験などから注意深く検討してきた。人工赤血球製剤は従来に無い、大量投与を伴う製剤であるため、その安全性試験法のマニュアルは存在せず、研究班が中心になって試験法を考えるとところから先見的学術研究として進めてきた。本総説では安全性研究の概略をまとめた。これらの結果を総合すると、安全性は担保されており、次段階に進むべき製剤であると考えられるが、更に必要な安全性試験があれば是非ともご指摘を頂き早急に対応し、次段階 GLP, GMP 試料による非臨床・臨床試験への円滑な移行に備えたい。

Abstract

A fluid of artificial red cells (hemoglobin-vesicles, HbV) is being developed as a transfusion alternative that comprises concentrated particle dispersion ([Hb]=10g/dL, occupied particle volume=40%) with comparable characteristics to those of blood. Encapsulation of a concentrated Hb solution with phospholipid vesicles can shield the toxic side effects of Hb. We have studied production methods, safety and efficacy of artificial red cells since 1997 under Health and Labour Sciences Research Grants. Efficacies of HbV as a resuscitative fluid for hemorrhagic shock resuscitation, priming fluid for extracorporeal circuit, and other uses have been clarified through in vivo evaluation. Moreover, the unique HbV characteristics of small particles, adjustable oxygen affinity, high viscosity, and CO binding are especially effective for therapeutic and surgical treatments (tumor, ischemic disease, reperfusion injury, and organ transplantation). We have particularly devoted attention to HbV-related safety issues because it is expected that the injection amount of HbV as a transfusion alternative would result in a massive dose such as 2-3 liters per patient. In fact, artificial red cells will become a newly categorized pharmaceutical drug. There is no manual for a safety study. We have considered the optimal protocols of safety evaluations as prospective studies. This report summarizes preceding studies of the HbV safety evaluations. The obtained results attest to the safety of HbV. However, we welcome suggestions for

(1) 奈良県立医科大学医学部化学教室 〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840 Department of Chemistry, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan

(2) 早稲田大学重点領域研究機構

(3) 慶應義塾大学医学部外科学

(4) さいたま市立病院

(5) 旭川医科大学小児科学

(6) 崇城大学薬学部

論文受付 2013 年 8 月 19 日 論文受理 2013 年 8 月 19 日

additional necessary safety studies. Through confirmation of HbV safety as a prospective avenue of research step-by-step, we intend to prepare for the preclinical and clinical stages of HbV development with GLP and GMP standards.

Keywords

blood substitutes, artificial oxygen carriers, liposome, hemoglobin, hemoglobin-vesicles, preclinical studies

緒 言

日本の献血－輸血システムの安全性は世界最高水準にあり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、感染の可能性、過誤による血液型不一致輸血、保存期限が3週間と短く災害や有事の危機管理体制に不安を残している。また、少子高齢化により血液の需給バランスが崩れつつあり、日本赤十字社の試算によれば2027年には101万人分の献血量が不足すると報告されている。人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）は、これらの問題を解決するための一助となりうる新しい製剤としてその実現が期待されている（図1）。ヘモグロビンを用いる人工赤血球の研究は、期限切れ血液に最も多く含まれるHbの有効利用の観点から政策的に始まった¹⁾。期限切れ赤血球は諸工程を経て、感染源を含まず、血液型が無く、長期保存に耐え、輸血治療を「補完」する人工赤血球製剤に「再生」される²⁾。1997年から厚生労働科学研究として継続的に推進され（研究代表者：土田英俊、小林紘一、堀之内宏久、酒井宏水）³⁻⁸⁾、ヘモグロビン精製、ヘモグロビンの内包、脂質膜の構成成分の改良、投与実験により有効性と安全性を検討し、結果をフィードバックさせ現行の製剤を確立した^{9,10)}。病態モデル（出血性ショック、体外循環、血液稀釈、皮弁創傷治療、担がん、血管性虚血性疾患など）で有効性を実証し（表1）¹¹⁻²⁰⁾、輸血代替としての利用のみならず、輸血では対応の出来ない疾患や外科的処置、Unmet Medical Needsへの対応も期待されている。

人工赤血球（Hb小胞体）製剤は、血液と同等の濃厚な微粒子分散液である（ヘモグロビン濃度10g/dL、粒子占有体積40%程度）⁹⁾。その投与量は一人当たり数リットル以上になることもあり得るので、生体に対する影響を動物投与試験などから明らかにすることは極めて重要である。人工赤血球製剤は従来に無い製剤であるため、開発者をはじめとするアカデミアが中心になって安全性試験法を考えるとところから先見的学術研究として進めてきた。実験に使用された試料は非GLPレベルの

ものであるが、人工赤血球が全くの新しい製剤であるので、その安全性を開発初期段階から明らかにすることは極めて重要と考え進めて来た。日本血液代替物学会で作成されたガイドライン「人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項」³⁰⁾も参考にしてきた。他方、平成24年3月に厚生省からICH合意に基づく新ガイドライン薬食審査発0323第1号「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」が発表された。ここでいうバイオ医薬品は、抗体医薬品が主な対象と考えられるが、ヒト血液由来のヘモグロビンを原料としているヘモグロビン小胞体は特定生物製剤であり、バイオ医薬品に該当する。記載されている試験項目のうち、我々アカデミアの研究班で既に検討済みの項目が多くあると考えられるものの、生殖発生試験やがん原性試験など、アカデミアのみでは実施困難な箇所もある。以下にこれまで我々の研究班で検討してきた安全性研究成果の概略（23報分）を列挙するが、結果の殆どは国際学術誌等で公表されているので、詳細はそちらを参照して頂きたい。更に必要な項目があれば是非ともご指摘を頂き早急に対応し、次段階GLP、GMP試料による非臨床試験への円滑な移行に備えたい。

ヘモグロビン小胞体の安全性試験結果の報告

1) 単回投与試験 (topload)

動物種：Wistar系ラット（♂）

投与試料：ヘモグロビン小胞体（プロトタイプ、負電荷脂質として1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol：DPPGを使用）、[Hb] = 10 g/dL

投与量：10mL/kg, 20mL/kg

麻酔：投与時および犠牲死時のみエーテル麻酔

投与経路：尾静脈

観察時間：投与後14日間

測定項目：体重、脾臓重量、食食能（カーボンクリアランス）、

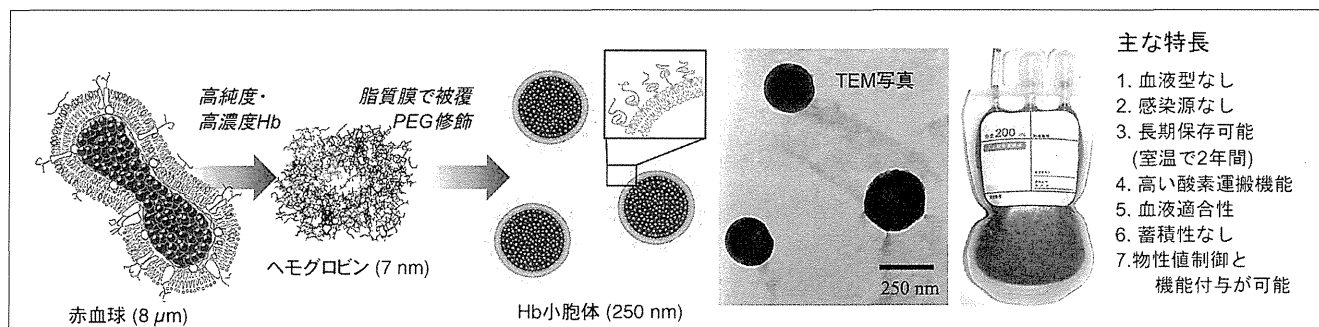


図1. ヘモグロビン小胞体制剤

表 1. 人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の有効性試験（論文掲載されたもの）

No.	動物試験	主な効能	掲載誌、発表年	引用文献番号
1	ラット, 90% 交換輸血	血圧維持, 赤血球と同等の酸素を運搬	ASAIO J 1998	11
			Bioconjugate Chem 2000	12
2	ラット, 50% 出血性ショック蘇生	出血性ショック蘇生に有効	Crit Care Med 2004	13
			Shock 2009	14
			JPET 2011	15
3	ウサギ, 40% 出血性ショック（反復出血）蘇生	サイトカイン TNF α 過剰産生の抑制	ASAIO J 2004	16
4	ビーグル犬, 50% 出血性ショック蘇生	中型動物での大量・急速蘇生	Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2012	17
5	ラット, 体外循環（人工心肺）充填液	高次脳機能を改善	Circulation 2003	18
6	ラット, 制御不能出血モデル蘇生	生存時間の延長	Shock 2012	19
7	ラット, 出血性ショック蘇生（CO 結合体の投与）	再灌流時における細胞保護効果の確認	Shock 2009	20
8	ハムスター, 50% 出血性ショック蘇生, 無麻酔	出血性ショック蘇生に有効, 微小循環の回復	Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002	21
9	ラット, 脳梗塞モデル	梗塞巣の拡大を抑制	Neurosci Lett 2007	22
10	マウス, 摘出小腸灌流	37°C, 2hr 灌流で組織構造を維持	Am J Physiol G 2008	23
11	ハムスター, 有茎皮弁虚血部位酸素化	側副経路を経由した酸素輸送を確認	Crit Care Med 2005	24
			Crit Care Med 2007	25
12	マウス, 皮弁モデル虚血領域酸素化	創傷治癒効果を確認	Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009	26
13	マウス, 担がんモデル	腫瘍重量の減少	J Surg Res 2009	27
14	ラット, ¹⁵ O-酸素結合 Hb 小胞体の脳梗塞モデルへの投与と PET 診断	脳梗塞領域のイメージング	Nuclear Med Biol 2010	28
			J Cereb Blood Flow Metab 2012	29

組織病理（H/E, 抗ヒト Hb 抗体免疫染色, ベルリンブルー染色, 電子顕微鏡観察）

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：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 Sep; 159(3): 1079-88.

主要結果：人工赤血球の投与によって、体重の増大、脾臓重量も増大。食食能は1日後に低下、3、7日後の亢進のあと14日後には正常値に復する。抗ヒトヘモグロビン抗体免疫染色の結果、人工赤血球由来のヒト Hb は、肝臓・脾臓から7日以内に殆どが消失し、14日以内に完全に消失した。肝臓クッパー細胞、脾臓マクロファージに捕捉されて分解消失、ベモジデリンの沈着が僅かに観察された。腎臓や肺には異常は認められない。電子顕微鏡観察から、肝臓クッパー細胞、脾臓マクロファージの食胞内に捕捉された人工赤血球が観察されたが、完全に消失した。

2) 単回投与試験（topload）

動物種：Wistar 系ラット（♂）

投与試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL

投与量：20mL/kg

麻酔：投与時および犠牲死させる時のみエーテル麻酔

投与経路：尾静脈

観察時間：投与後 14 日間

測定項目：体重、臓器重量（肝臓、脾臓）、血中 HbV 濃度、ヘマトクリット、血液生化学検査（総蛋白、アルブミン、AST、ALT、LDH、 γ -GPT、LAP、ChE、総ビリルビン、Fe、クレアチニン、BUN、UA、アミラーゼ、リパーゼ、CPK、K⁺、Ca²⁺、inorganic phosphate、総コレステロール、遊離コレステロール、コレステリルエステル、HDL コレステロール、 β リポ蛋白、TG、リン脂質、遊離脂肪酸、総脂質）、脾臓組織病理

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, Ikeda E, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E. Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. Biomaterials. 2004 Aug; 25(18): 4317-25.

主要結果：人工赤血球の投与によって、脾臓重量が増大するが、体重も増加するので脾臓重量分率としてみると、7日に

後に正常値に復する。血中酵素濃度ではアミラーゼの若干の減少とリパーゼの増大が見られたが、脾臓病理では異常は観察されず。その他の項目には特に異常値は認められず、臓器機能に影響は無いと考えられた。血中のコレステロール、リン脂質濃度が増大したが、7日で正常値に復した。これは、人工赤血球の脂質成分が遊離したものと考えられた。

3) 単回投与試験 (topload)

動物種：シリアンゴールデン ハムスター (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL (精製ヘモグロビン, 化学修飾ヘモグロビン)

投与量：7 mL/kg (循環血液量の 10%)

麻酔：無麻酔

投与経路：頸静脈

観察時間：投与後 24 時間

測定項目：血圧, 心拍数, 皮下抵抗血管の径 (正常値約 150 μ m) と血流速度

実施場所：カリフォルニア大学サンディエゴ校生体工学部

論文報告：Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Sep; 279(3): H908-15.

主要結果：化学修飾ヘモグロビンの投与によって血圧亢進や末梢循環不全が生起することが問題となっている。そこで、ハムスター皮下微小循環観測モデルを用い、人工赤血球と修飾ヘモグロビンの比較試験を行なった。修飾ヘモグロビンでは、投与と同時に抵抗血管の収縮と同時に、血圧亢進と心拍数の増大が認められたが、それに対して人工赤血球ではそのような反応は殆ど見られなかった。

4) 単回投与試験 (topload)

動物種：カニクイザル (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体を 5% リコンビナントアルブミンに分散, [Hb] = 8.6 g/dL

投与量：17.5 mL/kg

麻酔：無麻酔

投与経路：橈側皮静脈

観察時間：投与後 14 日間

測定項目：摂餌量, 体重変化, 血圧, 動脈血ガス組成, 血液生化学検査 (Na, K, Ca, Cl, glucose, 無機リン, 総蛋白, アルブミン, AST, ALT, γ -GTP, ALP, CRE, BUN, UA, amylase, lipase, リン脂質, TG, 総コレステロール, HDL コレステロール, 総ビリルビン), 血中 Hb 小胞体濃度

実施場所：熊本大学薬学部, 新日本科学

論文報告：Taguchi K, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. A fourteen-day observation and pharmacokinetic evaluation after massive infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers)

in cynomolgus monkeys. *J Drug Metab Toxicol* 2012; 3(4): 100128

主要結果：霊長類における安全性及び体内動態特性評価を目的とした。4 匹のカニクイザル (オス, 4~8 才, 5.57~5.93 kg) の静脈内にヘモグロビン小胞体を投与したところ、摂餌量・体重変化に特記する異常は確認されず、投与から観察終了まで、いずれのカニクイザルにおいても、異常行動・瀕死状態を示したものの、あるいは死亡した例はなかった。加えて、ヘモグロビン小胞体投与前後で収縮期血圧・拡張期血圧・血液ガスパラメータに変化は認められず、また、霊長類においてもヘモグロビン小胞体は十分な血中滞留性を維持していた。一方、12 項目の生化学検査値の中で AST, ALT の一過性の上昇及び脂質関係のパラメータに経時的な上昇が確認された。今回得られた知見は、ヘモグロビン小胞体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ル作成の重要な基盤情報になると考えられる。

5) 単回投与試験 (topload) 長期生存試験

動物種：Wistar 系ラット (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体 ([Hb] = 10 g/dL)

投与量：20 mL/kg

麻酔：投与時および犠牲死時のみエーテル麻酔

投与経路：尾静脈

観察時間：投与後 365 日

測定項目：体重, 血液生化学検査 (総蛋白, アルブミン, AST, ALT, LDH, γ -GPT, CPK, クレアチニン, BUN, UA, アミラーゼ, リパーゼ, 総コレステロール, TG, リン脂質, 遊離脂肪酸, ビリルビン, Fe³⁺), 剖検, 組織病理 (H/E 染色, Berlin Blue; 肝臓, 脾臓, 肺, 腎臓, 副腎, 睪臓, 睪丸, 胃, 筋肉, 皮膚)

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K. One-year observation of Wistar rats after intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers). *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2007; 35(1): 81-91.

主要結果：人工赤血球投与後、体重は増加し続け、264 $\pm$ 8 g から 821 $\pm$ 75 g にまで増大した。血液生化学では総蛋白や脂質濃度が増大したが、これは狭いケージの中に長期間飼われていたことによる肥満の影響と考えられた。過去の文献でパーフルオロカーボン微粒子を投与することにより肺に炎症が起こる事が報告されているが、人工赤血球投与群では肺には全く異常は認められなかった。

6) 単回投与試験 (topload) 血液学的観察, 反復投与による疑似アレルギー性反応の有無

動物種：WKAH 系ラット (♂), Brown Norway 系ラット (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL

投与量：単回投与 11.2 mL/kg, 反復投与 4 回 (2 日間隔), 反

復投与 3 回 (2 週間後, 4 週間後)

麻酔: 投与時および犠牲死時のみ

投与経路: 尾静脈

観察時間: 投与後 7 日

測定項目: 血球数 (赤血球, 血小板, 白血球), リンパ球, 単球,

顆粒球, $CD4^+/CD8^+$ 比, 補体価, 疑似アレルギー反応の有無
実施場所: 北海道赤十字血液センター研究部

論文報告: 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(2): 157-72.

主要結果: 単回投与試験において, ラットに投与したあと一週間, 血球数に著変は無かった。6 時間後のみ, 一過性にリンパ球数の減少と顆粒球数の増大が認められたが, 1 日後には正常値に復していた。 $CD4^+/CD8^+$ に著変なし。補体価は投与直後は変化しないが, 3 日後に低下した。血液と混合しても補体価は変化しないことから, この低下はアレルギー反応とは関係は無い。反復投与 4 回 (2 日間隔) の試験においては, 補体価が最初の投与で低下したが, その後は上昇した。反復投与 3 回 (2 週間後, 4 週間後) の試験において, 比較の ovalbumin で感作させたラットでは OVA 投与によってアナフィラキシー様反応により死亡例が出たが, ヘモグロビン小胞体の反復投与では死亡例は無く, 異常は全く観測されなかった。

7) 単回投与試験 (体内動態)

動物種: Sprague-Dawley 系ラット (♂), New Zealand 白ウサギ (♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体, $[Hb] = 10 \text{ g/dL}$

投与量: 14 mL/kg (一部を ^{99m}Tc ラベル)

麻酔: isoflurane

投与経路: 尾静脈

観察時間: 投与後 48 時間

測定項目: 血中 ^{99m}Tc -HbV 濃度, 全身の γ カメラ像, 脾臓と肝臓への移行量の時間変化, 48 時間後の臓器分布

実施場所: テキサス大学サンアントニオ ヘルスサイエンスセンター放射線科

論文報告: 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 Feb; 312(2): 702-9.

主要結果: 半減期はラットで 34.8h, ウサギで 62.6 時間, 48 時間後において, 肝臓, 脾臓, 骨髄への移行が顕著であった。

8) 単回投与試験 (体内動態)

動物種: Sprague-Dawley 系ラット (♂), New Zealand 白ウサギ (♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体, $[Hb] = 10 \text{ g/dL}$

投与量: 14 mL/kg (一部 Hb を ^{125}I -ラベル, コレステロールを ^3H -ラベル)

麻酔: isoflurane

投与経路: 尾静脈

観察時間: 投与後最長 14 日間

測定項目: 血中 ^{125}I -, ^3H - 推移, 鉄濃度推移, 臓器分布, 糞尿中 ^{125}I -, ^3H - 推移

実施場所: 熊本大学薬学部

論文報告: Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier. *Drug Metab Dispos.* 2009 Jul; 37(7): 1456-63.

主要結果: マウス投与試験から, ヘモグロビンの半減期は小胞体により 30 倍に延長された。また血中の血中 ^{125}I -, ^3H - 鉄濃度推移が同様であったことから, ヘモグロビン小胞体は血中では破壊されずに小胞体として循環していることが解った。ヘモグロビン小胞体は主に肝臓, 脾臓に移行し, 内部ヘモグロビンは 5 日以内に, 脂質膜成分 (コレステロール) は 14 日以内に臓器より消失した。また, 内封されたヘモグロビン及び脂質膜成分 (コレステロール) は分解された後にそれぞれ尿中及び糞中に排泄されることがわかった。

9) 反復投与試験

動物種: Wistar 系ラット (♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体, $[Hb] = 10 \text{ g/dL}$

投与量: $10 \text{ mL/kg} \times 14$ 日 (総投与量 140 mL/kg は, ラットの循環血液量 56 mL/kg の 2.5 倍)

麻酔: 投与時エーテル麻酔, その他は sevoflurane 吸入麻酔

投与経路: 尾静脈

観察時間: 投与期間 14 日のあと更に 14 日

測定項目: 体重, 血球数, 血液凝固機能 (APTT, PT, フィブリノゲン), 臓器重量 (肝臓, 脾臓, 腎臓), 尿検査, 血中 HbV 濃度, ヘマトクリット, 血液生化学検査 (総蛋白, アルブミン, AST, ALT, LDH, γ -GPT, LAP, ChE, 総ビリルビン, Fe, クレアチニン, BUN, UA, アミラーゼ, リパーゼ, アルドステロン, CPK, K^+ , Ca^{2+} , inorganic phosphate, 総コレステロール, 遊離コレステロール, コレステリルエステル, HDL コレステロール, β リポ蛋白, TG, リン脂質, 遊離脂肪酸, 総脂質), 乳酸値, グルコース, 血液ガス組成, 血圧, 心拍数, 組織病理 (肝, 脾, 腎, 肺, 心臓; H/E, ヘモジデリン), 免疫抗体染色 (HO-1 抗体, ヒト Hb 抗体)

実施場所: 慶應義塾大学医学部

論文報告: Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, Ikeda E, Sou K, Takeoka S, Suematsu M, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida

E. Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Dec; 311 (3): 874-84.

主要結果：14日間の連投によって循環血液量の2.5倍の人工赤血球の投与を受けた後も、ラットは体重増加し、全例が犠牲死させるまで（最長14日間）生存した。肝臓脾臓の肥大が顕著であったが、投与終了から14日経過した後は正常値に戻っていた。投与終了直後、血液生化学検査では、血中脂質・コレステロール濃度とリパーゼが一過性に上昇した他は特に異常なく、臓器機能にも問題は無いと考えられた。諸臓器のマクロファージに人工赤血球の貪食が認められたが、14日後には消失、ヘモジデリンの沈着が認められた。HO-1の発現が認められ、ヘムの代謝が亢進していると考えられた。ビリルビン濃度は上昇せず、血球数、尿検査には問題となる所見は無し。連投終了1日後にAPTTの延長傾向があったが有意差は無く、また14日後には正常値に復していた。Fibrinogenが若干増大した。血圧、心拍数、血液ガス組成に異常なし。以上のことから、大量投与した場合において、細網内皮系が人工赤血球の捕捉・分解をしており、十分に許容範囲内にあることが考えられた。

10) 反復少量投与 疑似アレルギー性反応の有無

動物種：NIBS ブタ (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体，[Hb]=10g/dL；比較として空の小胞体，およびDPPGを含有する小胞体

投与量：1回目 0.05mL/kg，70分後に0.5mL/kg

麻酔：N₂O：O₂=2：1の混合ガス / 2-3% Isoflurane 吸入麻酔

投与経路：大腿静脈

観察時間：2回目の投与の後60分

測定項目：血圧（大腿動脈圧），心拍数，心電図，肺動脈圧，左心室内圧，平均右心房圧，心拍出量，全身血管抵抗，全肺血管抵抗，血球数（血小板，白血球），血中トロンボキサンB2，肺組織病理，肺組織電子顕微鏡検査

実施場所：日本バイオリサーチセンター

論文報告：Sakai H, Suzuki Y, Sou K, Kano M. Cardiopulmonary hemodynamic responses to the small injection of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs. *J Biomed Mater Res A.* 2012 Oct; 100(10): 2668-77.

主要結果：実験動物の中でもブタは補体活性による循環動態の著変（疑似アナフィラキシー反応）が生じ易いことが良く知られている。そこで、ヘモグロビン小胞体（HbV），Hbを含有しない空の小胞体（EV），および補体活性が生じることが良く知られている脂質（DPPG）から成る従来の小胞体（CL）の投与を行なった。投与は1匹に対し2回行い、1回目は0.05mL/kg，70分後に10倍量の0.5mL/kgを投与した。CLの投与では、一過性の肺動脈圧の上昇，体動脈圧の上昇，心拍数の低下，心拍出量の低下，肺血管抵抗の上昇，

全身血管抵抗の上昇が，1回目の投与，2回目の投与両方で同様にみられた。また同時に，血小板数の低下，白血球数の低下と，トロンボキサンB2（TXB2）の顕著な上昇が認められた。他方，HbV，EVでは，1回目の投与では肺動脈圧と体動脈圧が上昇したものの，心拍出量には変化はなかった。また，血小板数の低下は無く，TXB2の上昇も軽微であった。2回目の投与では，肺動脈圧の上昇も殆ど無く，CL投与とは明らかに異なっていた。HbV，EVは補体活性は軽微（または無し）と考えられるが，肺血管内マクロファージに捕捉される際に肺動脈圧が上昇したのと考えられた。従って，現行のHb小胞体組成では，より生体適合性に優れることが明らかになった。

11) 血液希釈試験（出血に対する投与），造血機能，代謝

動物種：Wistar系ラット (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体を5%リコンビナントアルブミンに分散，[Hb]=8.6g/dL

投与量：1mLの脱血と，1mLの試料投与を繰り返し，循環血液量の40%を置換する。結果的に22.4mL/kgの投与量になる（循環血液量は56mL/kg）。（対照群，アルブミン単独投与，14日間保存赤血球をアルブミンに分散させたもの）

麻酔：血液交換と犠牲死時のみ Sevoflurane 吸入麻酔

投与経路：頸動脈から脱血と投与

観察時間：血液希釈完了後14日間

測定項目：体重，脾臓重量の体重に対する比率，ヘマトクリット，血球数，エリスロポエチン，血液生化学検査（アミラーゼ，リパーゼ，総コレステロール，遊離コレステロール，HDLコレステロール，βリポ蛋白，TG，リン脂質，遊離脂肪酸，総脂質，ビリルビン，Fe³⁺），組織病理（脾，肝臓，骨髓；ギムザ染色，ベルリンブルー染色），免疫抗体染色（HO-1抗体，ヒトHb抗体），

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：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 Mar; 46(3): 339-47.

主要結果：血液希釈後，体重は増加。脾臓重量率は3日後にピークを示し，その後減少。アルブミン投与群，保存赤血球投与群でも脾臓重量率の増大はみられた。ヘマトクリットは7日で正常値に復した。エリスロポエチンはアルブミン投与群で1日後に極めて高い値（300mIU/L）を示したが，人工赤血球投与群ではその半分程度であった。血液生化学では，人工赤血球投与群で1，3日後にリパーゼの上昇，コレステロールの上昇が見られた他は特に異常は認められなかった。脾臓病理では，Hb小胞体が貪食されている像と，赤芽球が大量に観察された。ラットの場合，脾臓は造血も行なわれており，脾臓でヘモグロビン小胞体の捕捉分解と造血の両方が

行なわれていた。保存赤血球投与群、人工赤血球投与群ともに脾臓にヘモジデリンが観察されたことから、人工赤血球は老化赤血球の捕捉分解過程と同様の経路を辿ることが考えられた。

12) 出血性ショック蘇生試験

動物種：Wistar 系ラット (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体を 5% リコンビナントアルブミンに分散, [Hb]=8.6 g/dL

投与量：循環血液量の 50% の脱血 (28 mL/kg), 15 分後に同量の人工赤血球を投与, 比較群は脱血液の投与 (返血)

麻酔：出血性ショック蘇生後 6 時間, および犠牲死時のみ Sevoflurane 吸入麻酔

投与経路：大腿静脈

観察時間：蘇生完了後最長 14 日間

測定項目：生存率, 体重, 脾臓・肝臓重量の体重に対する比率, 血圧, 心拍数, 血液ガス組成, グルコース, ヘマトクリット, 血球数, エリスロポエチン, 血液生化学検査 (AST, ALT, LDH, アミラーゼ, リパーゼ, CRE, UA, BUN, 総コレステロール, β リポ蛋白, リン脂質, ビリルビン, Fe^{3+}), 組織病理 (脾, 肝臓, 骨髄; ギムザ染色, ベルリンブルー染色), 血漿中サイトカイン濃度 (IL-1 α , -1 β , -2, -4, -6, -10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α), 組織病理 (H/E, Berlin blue, 抗 PEG 抗体免疫染色; 肝臓, 脾臓)

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Seishi Y, Obata Y, Takeoka S, Horinouichi H, Tsuchida E, Kobayashi K. Fluid resuscitation with artificial oxygen carriers in hemorrhaged rats: profiles of hemoglobin-vesicle degradation and hematopoiesis for 14 days. Shock. 2009 Feb; 31 (2): 192-200.

主要結果：循環血液量の 50% を脱血することにより顕著な低血圧, 過換気になったが, 人工赤血球の投与によってこれらは改善され, 脱血前の値にまで戻り, 脱血液の投与と同等であった。生存率も脱血液の投与と同等であった。脾臓重量は 3 日後にピークを示したが, その後低下した。ヘマトクリットは人工赤血球の投与によって血液稀釈の影響により半減するが, 1 週間で元に戻った。血小板数も稀釈により低下するが, 3 日後には正常値に復した。AST, ALT, LDH が蘇生 1 日後に上昇するが, 脱血液投与群と同等であり, 出血性ショックの影響と考えられた。総コレステロール, β リポ蛋白が 1 日後に増大したがその後正常値に復した。サイトカインレベル低値を推移した。組織病理より, 人工赤血球を捕捉したマクロファージは 14 日後には消失していた。PEG も 14 日後には消失していた。

13) 出血性ショック蘇生—長期生存試験

動物種：ビーグル犬 (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体を 5% リコンビナントアルブミンに分散, [Hb]=8.6 g/dL

投与量：1) 急速期：循環血液量 (86 mL/kg) の 50% の脱血, 60 分後に同量の人工赤血球を投与, 比較群は脱血液の投与 (返血), 主に血行動態を観察, 2) 長期観察：循環血液量の 40% の脱血, 同量の人工赤血球を投与。

麻酔：出血性ショック蘇生後 4 時間, および犠牲死時のみ Sevoflurane 吸入麻酔

投与経路：大腿静脈

観察時間：蘇生完了後 365 日間

測定項目：(出血ショック—蘇生時) 血圧, 肺動脈圧, 中心静脈圧, 肺動脈楔入圧, 心拍数, 心拍出量, 肺血管抵抗, 全身血管抵抗, 酸素消費量, 酸素運搬量, (長期生存例) 体重, ヘマトクリット, 血球数, 血液生化学検査 (AST, ALT, LDH, アミラーゼ, リパーゼ, CPK, LAP, CRE, UA, BUN, 総コレステロール, β リポ蛋白, リン脂質, 遊離脂肪酸, ビリルビン, Fe, Cu, K, IP, Mg, Ca), 組織病理 (脾, 肝臓, 腎臓, 肺, 脾臓, 心臓)

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Ikeda T, Horinouichi H, Izumi Y, Sakai H, Tsuchida E, Kobayashi K. 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 (Kim HW, Greenburg AG eds) Springer-Verlag, Germany, in press.

主要結果：ヘモグロビン小胞体による蘇生で全例が生存。体重の増加が見られた。血液生化学では脂質成分の増大が投与後 1 週間で見られるが, その後低下する。比較の脱血液投与群と同等の推移を示した。その他著変なし。別途実施した脾臓を摘出したビーグル犬ではヘモグロビン小胞体投与後に肺動脈圧の一過性上昇が観察されたが¹⁷⁾, 脾臓を摘出していない本実験モデルでは, 肺動脈の上昇は無かった。

14) 妊娠モデル反復投与試験

動物種：Wistar 系ラット (♀) 妊娠 12 日後

投与試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb]=10 g/dL (比較群, 生理食塩水)

投与量：2 mL/kg x 7 日 (総投与量 14 mL/kg は, ラットの循環血液量 56 mL/kg の 25%)

麻酔：isoflurane 吸入麻酔

投与経路：頸静脈 (カテーテル留置)

観察時間：投与期間 7 日間のあと更に 1 日

測定項目：母体重, 胎児体重, 胎盤重量, 母体臓器重量 (肝臓, 脾臓, 腎臓), ヘマトクリット, 血球数, Hb 濃度, 血液凝固機能 (APTT, PT, フィブリノゲン), 尿検査, 血中 HbV 濃度, 血液生化学検査 (総蛋白, アルブミン, AST, ALT, LDH, γ -GPT, LAP, ChE, 総ビリルビン, Fe, クレアチニン, BUN, UA, アミラーゼ, リパーゼ, CPK, K^+ , Ca^{2+} , inorganic phosphate, UIBC, 総コレステロール, 遊離コレステロール, コレステリルエステル, HDL コレス

テロール, β リボ蛋白, TG, リン脂質, 遊離脂肪酸, 総脂質), 乳酸値, グルコース, 血液ガス組成, 血圧, 心拍数, 組織病理 (ヘモジデリン, 抗ヒト Hb 抗体免疫染色: 脾臓, 肝臓, 胎盤結合部位, 胎盤迷路層, 胎児肝臓), ^{125}I -ラベル Hb 小胞体の体内動態 (血漿, 脾臓, 肝臓, 腎臓, 肺, 心臓, 胎盤, 胎児肝臓), 胎児肺のサーファクタント蛋白 (SP-A) 発現量
実施場所: 東北大学医学部, 国立精神神経医療研究センター, 熊本大学薬学部

論文報告: 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 Oct 5; 91 (11-12): 420-8

主要結果: 妊娠ラットに対する 7 日間の連投によって循環血液量の 1/4 の人工赤血球の投与を受けた後も, ラットは体重増加し, 全例が生じた。臓器重量, 胎児重量, 血液生化学, 血球数, 尿検査, 血行動態など, どの項目も比較の生理食塩水投与群と比較して有意な変化はなかった。母体側の脾臓, 肝臓で Hb 小胞体を捕捉したマクロファージの像が認められたが, 体内動態評価では, 人工赤血球は胎盤までは移行するが, 胎児には移行していないことを確認した。胎児肺のサーファクタント蛋白 (SP-A) 発現量にも異常は無く, 胎児への影響は見られなかった。

15) 脳内出血モデル

動物種: Wistar 系ラット (♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体を 5% リコンビナントアルブミンに分散, $[\text{Hb}] = 8.6 \text{ g/dL}$ (比較群, 洗浄赤血球を同様に分散させたもの)

投与量: 20 μL

麻酔: sevoflurane 吸入麻酔

投与経路: 脳実質に 28G 針を経由して投与

観察時間: 28 日間

測定項目: 体重, 行動学的テスト (旋回の有無, 立毛の有無, 下肢の強さ, 驚愕反射, 前肢握力), 脳組織病理 (H/E, 抗ヒト Hb 抗体免疫染色, 抗 HO-1 抗体免疫染色, 抗 GFAP 抗体免疫染色, Berlin blue), 電子顕微鏡観察

実施場所: 慶應義塾大学医学部

論文報告: Sakai H, Okamoto M, Ikeda E, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Histopathological changes of rat brain after direct injection of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. J Biomed Mater Res A. 2009 Sep 15; 90 (4): 1107-19.

主要結果: 脳に出血があり血液脳関門が破綻した状態で人工赤血球が投与された場合, 脳神経系と接触することになり, 何らかの影響を与える可能性がある。そこで, 脳内出血モデルとして少量の人工赤血球を脳実質に注入する実験を実施し

た。比較としてはラット洗浄赤血球を用いた。体重は増大し続け, 食餌に影響は無いと考えられた。行動学的観察においても対照群と比較して特に問題はなかった。組織病理では, 穿刺部位周辺に好中球が出現したが直ぐに消失した。脳実質中には人工赤血球が 28 日後にも認められたが, 脳組織の修復過程 (gliosis) には特に影響は見られなかった。本実験では人工赤血球による悪影響は認められなかった。

16) 肝硬変モデルへの単回投与試験

動物種: Sprague-Dawley 系ラット (♂) に対し, テトラクロロメタン (CCl_4) 400 mg/kg 腹腔内投与 (週 3 回) を 8 週間実施し肝硬変モデルを作成

投与試料: ヘモグロビン小胞体, $[\text{Hb}] = 10 \text{ g/dL}$ に rHSA を添加したもの。

投与量: 14 mL/kg (一部 ^3H -cholesterol を添加)

麻酔: エーテル

投与経路: 大腿静脈

観察時間: 投与後 14 日

測定項目: 血液生化学検査 (総蛋白, アルブミン, AST, ALT, γ -GTP, ALP, BUN, CRE, lipase, TG, リン脂質, 総コレステロール, HDL-コレステロール, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, 間接ビリルビン, Fe), 組織病理 (ベルリンブルー染色, 肝臓, 脾臓), 総抗酸化値 (Potential anti oxidant, PAO), チオバルビツール酸反応物質 (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS), 脾臓および肝臓内の還元型/酸化型グルタチオン比, 24 時間後および 48 時間後の ^3H 体内動態

実施場所: 熊本大学薬学部

論文報告: Taguchi K, Miyasato M, Ujihira H, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. Hepatically-metabolized and -excreted artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicles, can be safely used under conditions of hepatic impairment. Toxicol Appl Pharmacol. 2010 Nov 1; 248 (3): 234-41.

主要結果: 肝硬変モデルラットにヘモグロビン小胞体を投与した後, 血液生化学検査では, リパーゼ, ビリルビン, コレステロールの一過性上昇が見られたが, 14 日後には低下した。その他のパラメータでは著変なし。組織病理では, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 肺, 心臓に形態学的影響はなし。肝臓と脾臓にヘモジデリン沈着が認められたが, 酸化的ストレスの指標パラメータに著変無し。体内動態評価から, ^3H は主に肝臓, 脾臓に分布し, 7 日以内に糞中に排泄されることが解った。以上より, 肝硬変モデルにおいても, ヘモグロビン小胞体は分解排泄されることが解った。

17) 血液稀釈試験 (出血に対する投与), 各種代用血漿剤との併用の影響

動物種: Wistar 系ラット (♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体, $[\text{Hb}] = 10 \text{ g/dL}$, および各種

代用血漿剤（ヒドロキシエチルスターチ HES, 3 種, 修正ゼラチン MFG, リコンビナントアルブミン rHSA）

投与量：1mL の脱血と, 1mL の代用血漿剤の投与を繰り返し, 循環血液量の 60% を置換する（血液希釈）。そのあと, Hb 小胞体を 20mL/kg 投与する。

麻酔：Sevoflurane 吸入麻酔

投与経路：頸静脈から投与

観察時間：Hb 小胞体投与後 4 時間

測定項目：ヘマトクリット, 血圧, 心拍数, 血液ガス組成 (PaO₂, PaCO₂, BE, pH, Lactate, PvO₂, PvCO₂, 血液粘度)

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Miyagawa N, Horinouchi H, Takeoka S, Takaori M, Tsuchida E, Kobayashi K. Intravenous infusion of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) after repetitive blood exchange with a series of plasma expanders (water-soluble biopolymers) in a rat model. *Polymer Adv Technol* 2011 Nov; 22: 1216-22

主要結果：高分子量 HES 溶液や MFG 溶液にヘモグロビン小胞体を分散させると, 枯渇性相互作用 (depletion interaction: 非吸着性の巨大高分子鎖が粒子間の領域に存在できにくくなり (枯渇), その領域を少なくしようとする力 (凝集力) が発生する) によって小胞体が極めて弱い flocculation (凝集) を形成することが明らかになったので, それが血行動態に与える影響を調べるため, Hb 小胞体と代用血漿剤との併用試験を実施した。どの代用血漿剤を併用した場合もラットは 4 時間生存した。血行動態, 血液ガス組成ともに安定した値を推移した。従って, flocculation の影響は本モデル実験では認められなかった。

18) 免疫系への影響

動物種：WKAH ラット

投与試料：生理食塩水に分散したヘモグロビン小胞体 [Hb] = 10 g/dL

投与量：循環血液量の 20% (V/V)

麻酔：エーテル麻酔

投与経路：尾静脈

実験法：HbV (あるいは空リボソーム) を投与し, 翌日に脾臓を摘出し, 単細胞浮遊液としたのち, T 細胞の非特異的 mitogen (Concanavalin A; Con A) で刺激し, 脾 T 細胞の増殖反応を測定する。

測定項目：DNA への ³H-Thymidine の取り込み

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Takahashi D, Azuma H, Sakai H, Sou K, Wakita D, Abe H, Fujihara M, Horinouchi H, Nishimura T, Kobayashi K, Ikeda H. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive in ex vivo culture conditions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Apr; 337(1): 42-9.

主要結果：ヘモグロビン小胞体を投与した翌日の脾 T 細胞の

増殖はコントロールと比べて有意に抑制されていた。この抑制は投与後 3 日には観察されたが, 7 日目には完全に回復していた。蛋白抗原 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanine) に特異的な T 細胞増殖反応も同様に投与後 3 日まで抑制されていたが 7 日には完全に回復していた。空リボソーム (ヘモグロビンを内包していないリボソーム) の投与でも同様の現象が観察された。この現象は, ヘモグロビン小胞体 (or 空リボソーム) を貪食したマクロファージが一過性に, 免疫抑制機能を発揮するようになることが原因であること, その抑制にはマクロファージの産生する NO が関与している可能性のあることを報告した。一方, 蛋白抗原である KLH に対する抗体産生反応は, ヘモグロビン小胞体投与による影響を受けなかった。以上のことから, ヘモグロビン小胞体の投与で生体内の一部のマクロファージが免疫抑制機能を獲得する可能性があるが, あくまでも一過性であり, 全身的な免疫反応に対して, 重篤な影響を与える可能性は極めて低いと推察された。

19) 血液学的検討 (1) ヒト多形核好中球への影響

細胞種：ヒト多形核好中球

試料：ヘモグロビン小胞体 (プロトタイプ, DPPG を使用), [Hb] = 10 g/dL

実験方法：ヒト末梢血から単離したヒト多形核好中球に, 最大 0.6% の濃度で 30 分間作用させ, 洗浄後, ヒト多形核好中球の活性化剤 N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) 刺激の反応への前処置の影響を調べる。

測定項目：走化能, 接着因子の発現, 活性酸素産生, 脱顆粒

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Ito T, Fujihara M, Abe H, Yamaguchi M, Wakamoto S, Takeoka S, Sakai H, Tsuchida E, Ikeda H, Ikebuchi K. Effects of poly(ethylene glycol)-modified hemoglobin vesicles on N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced responses of polymorphonuclear neutrophils in vitro. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol*. 2001; 29 (6): 427-437

主要結果：fMLP 刺激による好中球の機能評価として, 好中球の走化能, β_2 インテグリンである CD11b の膜発現, 脱顆粒にともなう matrix metalloproteinase-9 の放出, 活性酸素の産生のいずれの項目においても, ヘモグロビン小胞体の前投与の影響はみられなかった。

20) 血液学的検討 (2) ヒト臍帯血の造血幹細胞

細胞種：ヒト臍帯血の造血幹 / 前駆細胞

試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL

実験方法：ヒト臍帯血から分離した CD34 陽性細胞を含む単核球を, 造血に働く各種サイトカインを添加した半固形培地に播種し, 2 週間または 4 週間培養により形成したコロニーの数を測定する。さらに CD34 陽性細胞を液体培養下にてヘモグロビン小胞体を添加し, 赤芽球系または顆粒球系の細胞へ

の増殖の影響を調べる。添加するヘモグロビン小胞体の最大濃度は3% (v/v) とする。

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Azuma H, Ikeda H. Influence of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells in vitro. J Biomed Mater Res A. 2009 Jan; 88(1): 34-42.

主要結果：in vitro の閉鎖系において、Hb 小胞体を長期間にわたり造血前駆細胞と共存させると、造血前駆細胞のコロニー形成能や、赤芽球系または顆粒球系の細胞への増殖を抑制したが、Hb 小胞体との共存期間が3日間までであれば、造血前駆細胞のコロニー形成能や、赤芽球系または顆粒球系の細胞への増殖への影響は少ないことが示された。

21) 血液学的検討 (3) ヒト臍帯血の造血幹/前駆細胞

細胞種：ヒト臍帯血の造血幹/前駆細胞

試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb]=10 g/dL

実験方法：ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞と骨髓由来ストローマ細胞との14日間の共培養により、造血幹細胞/造血前駆細胞を増幅させる系にヘモグロビン小胞体を作用させ、未熟な造血幹/造血前駆細胞の活性を測定する。添加するヘモグロビン小胞体の最大濃度は3% (v/v) とする。

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Hamada H, Azuma H, Ikeda H. Biocompatibility study of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, with human umbilical cord hematopoietic stem/progenitor cells using an in vitro expansion system. ASAIO J. 2009 May-Jun; 55(3): 200-5.

主要結果：ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞と骨髓由来ストローマ細胞の共培養系にヘモグロビン小胞体が培養期間14日間有る場合には、造血幹細胞/造血前駆細胞の増幅が抑制された。ヘモグロビンを含まない空の小胞体の場合は、抑制効果が軽減することから、ヘモグロビンの作用が示唆された。一方、ヘモグロビン小胞体との共存が3日間までの短期間であれば造血幹細胞/造血前駆細胞の増幅に影響をあたえないことを明らかとした。

22) 血液学的検討 (4) ヒト血小板

細胞種：ヒト血小板

試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb]=10 g/dL

実験方法：In vitro にてヒト血小板とヘモグロビン小胞体を0, 20, 40% (vol/vol) で1時間インキュベーションし、血小板のアゴニスト刺激による血小板活性化の評価を、血小板 α 顆粒中の RANTES と β -thromboglobulin (β -TG)、濃染顆粒に存在するセロトニンの各放出反応およびポジティブフィードバックによって血小板活性化を増幅する Thromboxane A_2 (TXA $_2$) の産生、さらに α 顆粒由来の CD62P の膜表面への

発現と血小板膜糖タンパク (α IIb β 3) の構造変化を認識する抗体 PAC-1 (first procaspase activating compound) の結合を指標とした。

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：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 Substit Immobil Biotechnol. 2005; 33(2): 101-11.

主要結果：アゴニスト刺激の無い場合は、血小板反応上清中の RANTES, セロトニン, β -TG, TXB $_2$ および血小板表面 CD62P のレベルの上昇はみられず、ヘモグロビン小胞体に血小板活性化作用は無いと考えられた。アゴニスト刺激により血小板の脱顆粒を惹起させると、いずれの濃度のヘモグロビン小胞体処理においても RANTES, セロトニン, β -TG の放出, TXB $_2$ の産生, および CD62P 発現が引き起こされ、そのレベルはヘモグロビン小胞体未処理のものと有意差はみられなかった。一方、PAC-1 の発現はヘモグロビン小胞体未処理では影響がないものの、ヘモグロビン小胞体処理により低濃度の ADP 刺激血小板において僅かな亢進がみられたが、この程度の変化の臨床的意義は少ないと考えられた。以上のことから、ヘモグロビン小胞体は低濃度のアゴニスト存在下で α IIb β 3 の構造変化を僅かに促進するものの、その他の活性化マーカーにはアゴニスト刺激の有無にかかわらず影響を与えないことから、ヒト血小板に悪影響を示さないことが明らかとなった。

23) 血液学的検討 (5) ヒト血漿タンパク

細胞種：ヒト血漿中の補体, 凝固因子, キニン・カリクレイン

試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb]=10 g/dL; 比較として強陰性荷電の空の小胞体, および DPPG を含有する小胞体

実験方法：ヘモグロビン小胞体を健常人ヒト血清と20%あるいは40%で混合し、37℃にて24時間インキュベーション後、遠心により各種 HbV を除去し、その上清の補体価 (CH50) を測定した。凝固系に及ぼす影響は、対象を生食とし、ヒト血漿にヘモグロビン小胞体添加 (20%, 40%, 60%) した場合のプロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。カリクレイン-キニン系に対する影響は、血漿にヘモグロビン小胞体または生食を添加し、37℃にて24時間インキュベーション後、血漿中高分子キノーゲンの分解による低分子化された高分子キノーゲンの出現をイムノブロットング法にて検出した。

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：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): 1-10.

主要結果：陽性対照として、強陰性荷電 PEG 未修飾リボソームを添加した群では著しい CH50（補体価）の低下がみられるのに対し、ヘモグロビン小胞体を 20%あるいは 40%で添加した群では、それぞれ生食を添加した場合に比べて、CH50 の減少はみられなかった。PT 時間については、ヘモグロビン小胞体は添加量のいずれの濃度でも、生食添加の場合より有意に短縮させたが、その差は 1 秒以内であった。APTT 時間はどの血漿比率の場合においても生食の場合と違いはみられなかった。血漿に対し 40%あるいは 60%にて DPPG-ヘモグロビン小胞体または PEG 未修飾の DPPG-ヘモグロビン小胞体を添加させた場合、intact な高分子キニノーゲンが減少と低分子化された高分子キニノーゲンの増加が顕著に観察されたが、現行のヘモグロビン小胞体ではいずれの血漿比率の場合においても生食の場合と違いはみられず、血漿中高分子キニノーゲンの分解を引き起こさないことがわかった。以上のことから、現行のヘモグロビン小胞体のヒト血漿タンパクへの高い生体適合性が示された。

まとめ

人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）分散液は、血液と同等の高濃度微粒子分散液である。そのため、血液と同等の粘性を有し、血液と同様にヘモグロビン濃度に応じた酸素運搬機能を有する。大量投与を伴うモデル実験においても動物は犠牲死させるまで生存し、外見上の著変は認められない。血液学的検討では、一般に微粒子分散液の投与は補体活性によるアナフィラキシー様反応を生起する場合があるが、ヘモグロビン小胞体では粒子表面の工夫によってこれが抑制されている。血小板や血液凝固系に与える影響も精査しているが、異常は認められない。血行動態についても、修飾ヘモグロビン溶液系で観測される血管収縮や血圧亢進は、ヘモグロビンをカプセル化することによって抑制される。これはヘモグロビンによる血管内皮由来弛緩因子である NO の捕捉がカプセル化によって遅延される物理化学的な現象に起因していると考えている^{31,32)}。体内動態においては、ヘモグロビン小胞体は血液中で分解することなく微粒子として血流に乗って循環し、最終的には細網内皮系（主に肝臓、脾臓）に移行し、そこで完全に分解され、その成分は糞、尿中に排泄されることが放射化ラベル化合物の投与試験から解った。反復投与により循環血液量の実に 2.5 倍の人工赤血球を投与する試験において、肝臓脾臓にはヘモジデリン沈着が認められるが、それによる悪影響は観察されていない。肝臓脾臓の肥大は一過性であり、完全に回復し、可逆性があった。血中半減期は 3 日程度ではあるが、代謝分解の過程は献血液と同等と考えられた。人工赤血球は赤血球と同様に膠質浸透圧を持たず、大量投与に際しては代用血漿剤の併用も必要となるが、薬剤との併用による悪影響は見られなかった。脳内出血モデル、ビーグル犬を使った出血性ショック蘇生試験においても、全例が生存している。ラット制御不能出血モデルに対する大量投与に際しても、短期的に問題が無いことを確認しているなど¹⁹⁾、表 1 にまとめた効能評価試験においても、動物が犠牲死させる

まで特段の影響なく生存することが解っている。ラット妊娠モデル、カンクイザルを使った試験でも、著変は認められていない。つい最近、復帰突然変異試験（Ames 試験）でも遺伝子突然変異誘発性が無いことを確認した。このように、ヘモグロビン小胞体制剤は、多方面に亘り安全性が確認されている。

修飾ヘモグロビン溶液系では、投与後に血漿が赤くなるため、血液生化学検査において比色分析、比濁分析に干渉作用を与えることが問題となっている。これに対してヘモグロビン小胞体では血漿から容易に分離が出来るので、干渉作用を回避できることを確認している³³⁾。これも一つの安全性試験項目といえる。またこの分離技術によって、上述のように多項目に亘る血液生化学検査が可能となり、ヘモグロビン小胞体の安全性が明らかになっている。

ところで、これまで課題とされてきた製造法については、混錬法による簡便化が可能になり量産に目処がついた（2012 年に PCT 出願済）。また投与後のメトヘモグロビンの漸増については、生体内の電子供与系の活用によってメトヘモグロビンを繰り返し還元型ヘモグロビンに還元出来ることを出血性ショック蘇生モデルラットの実験から明らかにしているの、課題は解決できると考えている。

ヘモグロビン小胞体制剤は、アカデミアを中心に開発してきた、極めて完成度の高い医薬品の候補物質であると自負している。是非とも日本発の医薬品として実用化に繋げたい。読者の皆様からの引続きのご支援、ご協力をお願いしたい。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金および日本学術振興会科学研究費補助金を受けて推進された。また、本研究班にご参画頂いた以下の多くの分担研究者、研究協力者の諸先生方のご貢献に心より感謝申し上げます。

（敬称略）

早稲田大学：土田 英俊（故）、西出 宏之、武岡 真司、宗 慶太郎
慶應義塾大学：四津 良平、末松 誠、武田 純三、相川 直樹、村田 満、渡辺 真純、饗庭 了、泉 陽太郎、山崎 正敬、山本 学、河野 光智、池田 達彦、勢司泰久

山口大学：池田 栄二

北海道赤十字血液センター：関口 定美（故）、池田 久實、藤原 満博、高橋 大輔、阿部 英樹

東宝塚さとう病院：高折 益彦

崇城大学：田口 和明

熊本大学：丸山 徹

日本医科大学：小川 龍、坂本 篤裕、寺嶋 克幸

防衛医科大学校：大鈴 文孝

福井大学：藤林 康久、岡沢 秀彦

国立精神神経医療センター：太田 英伸

Univ. of California, San Diego: Marcos Intaglietta

Univ. of Texas, San Antonio: William T. Phillips

Weill Med. College of Cornell Univ.: Michiko Okamoto

Inselspital University Hospital, Bern: Dominique Erni

引用文献

1. 酒井宏水, 土田英俊. 人工赤血球の過去, 現在, 未来. ファルマシア 2009; 45: 23-28
2. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: Present Situation and future vision. J Intern Med 2008; 263: 4-15.
3. 厚生科学研究費補助金 (高度先端医療研究事業)「酸素運搬機能を有する人工赤血球の創製と その評価に関する研究」平成 9-11 年度 総合研究報告書, 主任研究者: 土田英俊. 2000 年 4 月 10 日提出
4. 厚生労働科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)「臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究」平成 12-14 年度総括研究報告書, 主任研究者: 土田英俊. 2003 年 3 月提出
5. 厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「人工赤血球の安全性向上に関する研究」平成 15-17 年度 総合研究報告書, 主任研究者: 小林絃一. 2006 年 4 月提出
6. 厚生労働科学研究費補助金 (政策創薬総合研究事業)「人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究」平成 18-20 年度 総合研究報告書, 研究代表者: 小林絃一, 堀之内宏久. 2009 年 4 月提出
7. 厚生労働科学研究費補助金 (政策創薬総合研究事業)「人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定と GMP 製造技術の確立」平成 21-23 年度 総合研究報告書, 研究代表者: 堀之内宏久. 2012 年 5 月提出
8. 厚生労働科学研究費補助金 (創薬基盤推進研究事業)「人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) 製剤の実用化を目指す研究」平成 24 年度 総括・分担研究報告書, 研究代表者: 酒井宏水. 2013 年 5 月提出
9. Sakai H, Sou K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a transfusion alternative. Methods Enzymol 2009; 465 (Liposomes Part G): 363-384.
10. Sakai H, Takeoka S, Kobayashi K. Gas bioengineering using hemoglobin-vesicles for versatile clinical application. Curr Pharmaceut Design 2011; 17: 2352-2359.
11. Izumi Y, Sakai H, Kose T, Hamada K, Takeoka S, Yoshizu A, Horinouchi H, Kato R, Nishide H, Tsuchida E, Kobayashi K. Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model. ASAIO J. 1997; 43: 289-97.
12. 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. Bioconj Chem. 1997; 8: 23-30.
13. 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: 539-45.
14. Sakai H, Seishi Y, Obata Y, Takeoka S, Horinouchi H, Tsuchida E, Kobayashi K. Fluid resuscitation with artificial oxygen carriers in hemorrhaged rats: profiles of hemoglobin-vesicle degradation and hematopoiesis for 14 days. Shock. 2009; 31: 192-200.
15. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles prevents Escherichia coli growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. J Pharmacol Exp Ther. 2011; 337: 201-8.
16. 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: 458-63.
17. Yamamoto M, Horinouchi H, Kobayashi K, Seishi Y, Sato N, Itoh M, Sakai H. Fluid resuscitation of hemorrhagic shock with hemoglobin vesicles in Beagle dogs: pilot study. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2012; 40: 179-95.
18. Yamazaki M, Aeba R, Yozu R, Kobayashi K. Use of hemoglobin vesicles during cardiopulmonary bypass priming prevents neurocognitive decline in rats. Circulation. 2006; 114 (1 Suppl): I220-5.
19. Seishi Y, Horinouchi H, Sakai H, Kobayashi K. 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. Shock. 2012; 38: 153-8.
20. Sakai H, Horinouchi H, Tsuchida E, Kobayashi K. Hemoglobin vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. Shock. 2009; 31: 507-14.
21. Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, Tsai AG, Intaglietta M, Tsuchida E. Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002; 283: H1191-9
22. Komatsu H, Furuya T, Sato N, Ohta K, Matsuura A, Ohmura T, Takagi S, Matsuura M, Yamashita M, Itoda M, Itoh J, Horinouchi H, Kobayashi K. Effect of hemoglobin vesicle, a cellular-type artificial oxygen carrier, on middle cerebral artery occlusion- and arachidonic acid-induced stroke models in rats. Neurosci Lett. 2007; 421: 121-5.
23. Verdu EF, Bercik P, Huang XX, Lu J, Al-Mutawaly N, Sakai

- H, Tompkins TA, Croitoru K, Tsuchida E, Perdue M, Collins SM. The role of luminal factors in the recovery of gastric function and behavioral changes after chronic *Helicobacter pylori* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 295: G664-70.
24. Contaldo C, Plock J, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leunig M, Banic A, Erni D. New generation of hemoglobin-based oxygen carriers evaluated for oxygenation of critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med*. 2005; 33: 806-12.
 25. Plock JA, Tromp AE, Contaldo C, Spanholtz T, Sinovcic D, Sakai H, Tsuchida E, Leunig M, Banic A, Erni D. Hemoglobin vesicles reduce hypoxia-related inflammation in critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med*. 2007; 35: 899-905.
 26. Plock JA, Rafatmehr N, Sinovcic D, Schnider J, Sakai H, Tsuchida E, Banic A, Erni D. Hemoglobin vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic skin in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H905-10.
 27. Yamamoto M, Izumi Y, Horinouchi H, Teramura Y, Sakai H, Kohno M, Watanabe M, Kawamura M, Adachi T, Ikeda E, Takeoka S, Tsuchida E, Kobayashi K. Systemic administration of hemoglobin vesicle elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J Surg Res*. 2009; 151: 48-54.
 28. Tiwari VN, Kiyono Y, Kobayashi M, Mori T, Kudo T, Okazawa H, Fujibayashi Y. Automatic labeling method for injectable ¹⁵O-oxygen using hemoglobin-containing liposome vesicles and its application for measurement of brain oxygen consumption by PET. *Nucl Med Biol*. 2010; 37: 77-83.
 29. Kobayashi M, Mori T, Kiyono Y, Tiwari VN, Maruyama R, Kawai K, Okazawa H. Cerebral oxygen metabolism of rats using injectable ¹⁵O-oxygen with a steady-state method. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012; 32: 33-40.
 30. 高折益彦. “人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項(案)”を概説する. *人工血液* 2005; 13: 104-111.
 31. Sakai H, Sato A, Masuda K, Takeoka S, Tsuchida E. Encapsulation of concentrated hemoglobin solution in phospholipid vesicles retards the reaction with NO, but not CO, by intracellular diffusion barrier. *J Biol Chem*. 2008; 283: 1508-17.
 32. Sakai H, Okuda N, Sato A, Yamaue T, Takeoka S, Tsuchida E. Hemoglobin encapsulation in vesicles retards NO and CO binding and O₂ release when perfused through narrow gas-permeable tubes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298: H956-65.
 33. Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, Takeoka S, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Pretreatment of serum containing hemoglobin vesicles (oxygen carriers) to prevent their interference in laboratory tests. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41: 222-31.

Chapter 6

Biocompatibility of a Highly Concentrated Fluid of Hemoglobin-Vesicles as a Transfusion Alternative

Hiromi Sakai^{*,†,‡}

1. Introduction

Blood transfusion systems have greatly benefited human health and welfare. Nevertheless, some problems remain: possibility of infection, blood type mismatching, immunological response, and a short shelf life that is insufficient for stockpiling for emergency situations. Realization of artificial O₂ carriers is anticipated to solve such problems. The most abundant protein in blood is Hb ([Hb] = 12–16 g/dL in healthy human blood), indicating that oxygen transport to tissues is the most important function of blood. To design an oxygen-carrying fluid to substitute the function of blood, the Hb concentration of the fluid should be high and comparable with that of blood Hb concentration. Chemically modified and cell-free Hb-based oxygen carriers (HBOCs), such as intramolecularly crosslinked, polymerized, and polymer-conjugated Hbs, were synthesized to prevent toxic effects of cell-free Hbs.¹ The hydrodynamic radius of such cell-free HBOCs is less than 20 nm. On the other hand, hemoglobin-vesicles (HbV) or

*Waseda Bioscience Research Institute in Singapore, Biopolis, Republic of Singapore.

†Organization for University Research Initiatives, Waseda University, Tokyo, Japan.

‡Department of Chemistry, Nara Medical University, Kashihara, Japan.

2 Selected Topics in Nanomedicine

so-called liposome-encapsulated Hb, which encapsulate a concentrated Hb solution in phospholipid vesicles, are developed.^{2,3} One particle of about 250–280 nm encapsulates nearly 30,000 Hb molecules. In the case of the chemically modified cell-free HBOCs, they are “**dissolved**” in aqueous solutions like plasma proteins. On the other hand, HbV as a cellular HBOC is “**dispersed**” in aqueous solutions like blood cells. The difference between dissolution and dispersion results in a considerable difference in physicochemical characteristics of the fluids containing a high concentration of Hb. The fluid properties should be adjusted within the biocompatible and physiological conditions for a massive blood exchange. In this chapter I first summarize some views of physicochemical differences between cell-free and cellular HBOCs. Second, biocompatibility of the dispersed particle is of course important. The blood compatibility, biodegradability, excretion, and immunological responses to the massive injection of such dispersed small particles are summarized.

2. Biocompatible Solution Properties of HbV Fluids

2.1. Colloid Osmotic Pressure

Albumin, dissolved in a blood plasma at ca. 5 g/dL, provides sufficient colloid osmotic pressure (COP, ca. 20 Torr) to play an important role in equilibrating COP between blood and interstitial fluid, thereby maintaining the overall blood volume. This COP is one requisite for a transfusion alternative to sustain blood circulation for transporting oxygen and metabolites. The extremely high concentration of the HbV suspension ([Hb]) 10 g/dL; [lipids] 6 g/dL, volume fraction, ca. 40 vol % imparts an O₂ carrying capacity that is comparable to that of blood. The HbV suspension does not possess a colloid osmotic pressure (COP), because one HbV particle (ca. 250 nm diameter) contains about 30,000 Hb molecules. In fact, HbV acts as a particle, not as a solute. Therefore, HbV must be suspended in or coinjected with an aqueous solution of a plasma substitutes. This requirement is identical to that for emulsified perfluorocarbon, which does not possess COP^{4,5}; it contrasts to characteristics of other Hb-based O₂ carriers, intramolecular cross-linked Hbs,

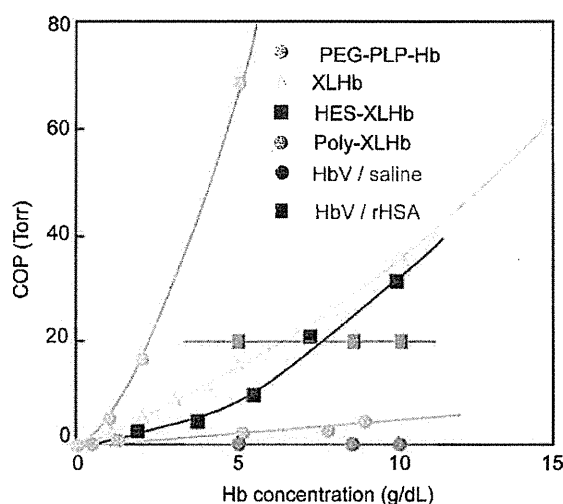
Biocompatibility of a Highly Concentrated Fluid of HbV 3

Fig. 1. Colloid osmotic pressures of cell-free and cellular HBOCs.⁶ COP of HbV is determined by the suspending medium. For example, 5% albumin has 20 torr COP. It does not exceed the physiological condition at any Hb concentration.

polymerized Hbs, and polymer-conjugated Hbs, which all possess very high COP as protein solutions^{6,7} (Fig. 1). These chemically modified Hb solutions can be categorized as “O₂-carrying plasma expanders”⁸ because they have the oxygen-carrying capacity and colloid osmotic pressure. However, the problem with PEG-modified Hb solutions is that the COP is too high such that the Hb concentration of the resulting fluid is as low as 4–6 g/dL. On the other hand, HbV suspended in any plasma expander shows COP of the suspending medium, at any Hb concentration. When HbV is suspended in 5%-human serum albumin solution (HSA), COP is nearly 20 mmHg, which is in a physiological range of COP.

According to the guideline for safer blood transfusion, a transfusion trigger (the critical Hb level) is 6 g/dL to minimize unnecessary transfusion strictly or to avoid allogeneic transfusion as long as possible. But the problem of HBOCs with low Hb concentration is that injection of HBOCs cannot increase blood Hb level. In fact, according to the retrospective description of Nosé, pyridoxalated Hb polyoxyethylene

4 *Selected Topics in Nanomedicine*

conjugated (PHP) had the same problem, and it was not easily approved for clinical study during the negotiation of the FDA.⁹ The Hb concentration of HbV is adjusted to 10 g/dL, which is higher than the concentration of transfusion trigger.

2.2. *Flocculate Formation and Viscosity Increase in the Presence of Plasma Expanders*

Animal tests of HbV suspended in plasma-derived HSA or recombinant HSA (rHSA) showed an O₂ transporting capacity that is comparable to that of blood.^{10,11} We reported that HbV suspended in plasma-derived HSA or rHSA was almost Newtonian: no aggregation was detected microscopically.^{12,13} In Japan, rHSA was very recently approved for clinical use, in May 2008,¹⁴ but various plasma substitutes are used worldwide, such as hydroxyethyl starch (HES), dextran (DEX), and modified fluid gelatin (MFG). The selection among these plasma substitutes is best determined not only according to their safety and efficacy, but also according to their associated price, experience of clinicians, and customs of respective countries. Water-soluble polymers generally interact with particles such as polystyrene beads, liposomes, and RBCs to induce aggregation or flocculation.^{15,16} As for the cell-free HBOCs dissolved in saline, they are Newtonian fluids, and do not interact with plasma expanders. In the case of cellular HBOC dispersed in saline, it is important to determine the compatibility of HbV with these plasma substitutes. With that background, we studied rheological properties of HbV suspended in these plasma substitute solutions using a complex rheometer and a microchannel array.¹⁷ The rheological property of an HBOC is important because the infusion amount is expected to be considerably large, which might affect the blood viscosity and hemodynamics. The HbV suspended in rHSA was nearly Newtonian (Fig. 2). Its viscosity was similar to that of blood, and the mixtures with RBCs at various mixing ratios showed viscosities of 3–4 cP. Other polymers, HES, DEX, and MFG, induced flocculation of HbV, possibly by depletion interaction, and rendered the suspensions as non-Newtonian with the *shear-thinning* profile. These HbV suspensions showed high viscosity and a high storage modulus (G')

Biocompatibility of a Highly Concentrated Fluid of HbV 5

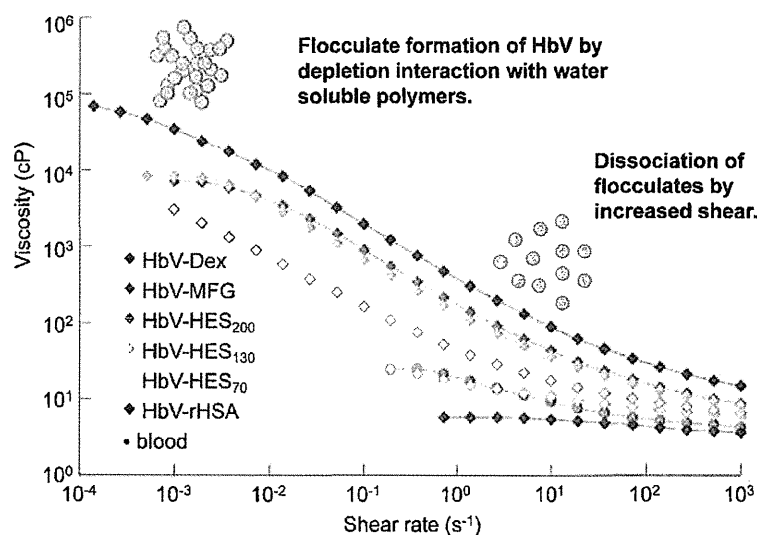


Fig. 2. Shear-thinning profiles of HbV suspended in a series of plasma expanders. $[\text{Hb}] = 10 \text{ g/dL}$.¹⁷

because of the presence of flocculated HbV. On the other hand, HbV suspended in rHSA exhibited a very low G' . The viscosities of HbV suspended in DEX, MFG, and high-molecular-weight HES solutions responded quickly to rapid step changes of shear rates of $0.1\text{--}100 \text{ s}^{-1}$ and a return to 0.1 s^{-1} , indicating that flocculation formation is both rapid and reversible. Microscopically, the flow pattern of the flocculated HbV perfused through microchannels ($4.5 \mu\text{m}$ deep, $7 \mu\text{m}$ wide, $20 \text{ cm H}_2\text{O}$ applied pressure) showed no plugging.

The mechanism of flocculate formation of liposome is controversial.¹⁸ However, we believe PEG-modified liposomes are flocculated by depletion interaction. The flocculation level increased with hydrodynamic radius (R_h) or radius of gyration (R_g) of series of HES or DEX with different molecular weights at a constant polymer concentration (4 wt%). However, the flocculation level differed markedly among the polymers (Fig. 3). A crowding index (C_i) representing the crowding level of a polymer solution is defined as (excluded volume of one polymer) $\times$ (molar concentration) $\times$ Avogadro's number, using R_h