

## 目 次

# 人工血液

第 17 卷 第 4 号 2010 年 2 月

会告	.....	146
総説	Acellular Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Induced Vasoactivity: a Brief Review of Potential Pharmacologic Remedies .....	Hae Won Kim 他 147
	水中で二原子分子 ( $O_2$ , CO, NO) を捕捉する完全合成化合物 .....	北岸 宏亮 他 160
	ヘモグロビン小胞体 (HbV) の体内動態特性 .....	田口 和明 他 169
トピックス		
	リポソームヘモグロビン投与下の心筋灌流 .....	松本 健志 179
事務局たより	.....	186

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 17 No. 4 Feb, 2010

## Contents

Announcement .....	146
Review: Acellular Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Induced Vasoactivity: a Brief Review of Potential Pharmacologic Remedies .....	Hae Won Kim, et al. 147
Completely Synthetic Compounds That Bind Diatomic Molecules ( $O_2$ , CO, NO) in Aqueous Solution .....	Hiroaki Kitagishi, et al. 160
The Pharmacokinetic Properties of Hemoglobin-vesicles .....	Kazuaki Taguchi, et al. 169
Topics : Application of Liposome-encapsulated Hemoglobin to Myocardial Perfusion .....	Takeshi Matsumoto 179

# 会 告

## 第17回日本血液代替物学会年次大会

期 日：2010年10月18日(月)～19日(火)

会 場：熊本市国際交流会館（熊本市花畠町）

大会長：小田切 優樹（崇城大学薬学部教授・熊本大学客員教授）

テーマ：「**血液代替物科学の最前線**」

プログラム：

シンポジウム1（人工酸素運搬体の臨床応用）

シンポジウム2（人工血小板の現状と将来）

シンポジウム3（細胞型ナノ医薬品の新展開）

特別講演

大会長講演

詳細はホームページなどでお知らせする予定です。

<http://www.blood-sub.jp/info/announce.html>

# Acellular Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Induced Vasoactivity: a Brief Review of Potential Pharmacologic Remedies

Hae Won Kim <sup>(1)</sup>, Chi-Ming Hai <sup>(1)</sup>, A. Gerson Greenburg <sup>(2)</sup>

## Abstract

Hemoglobin-based oxygen carriers( HBOCs )are currently in late phase clinical development as potential red blood cell substitutes. However, in recent clinical trials, most HBOC products have elicited vasoconstriction and blood pressure elevation. Mechanisms of the HBOC-mediated vasoactivity have not been fully elucidated. However, regardless of mechanisms involved, observations from preclinical and clinical studies indicate that the HBOC-mediated vasoconstriction/blood pressure elevation can be attenuated by conventional and newer anti-hypertensive agents and vasodilators. These include calcium channel blockers, nitrovasodilators, ACE inhibitors, selective PDE inhibitors and inhalation of gaseous NO or nebulized nitrites. There is little information available regarding the safety and effectiveness of these agents when used for treatment of HBOC-mediated vasoconstriction and BP elevation. In this review we identify some potentially useful pharmacologic agents and discuss potential issues involved in their use with HBOCs.

## Keywords

acellular hemoglobin, hemoglobin-based oxygen carriers, vasoactivity, pressor effect, vasodilators, anti-hypertensive agents.

## 1. Introduction

Artificial oxygen carriers based on chemically modified or recombinant human or animal hemoglobins( Hb )are promising as red blood cell substitutes because they have some specific advantages over allogeneic donor red cells<sup>1)</sup>. For example, they are virtually pathogen-free, can be stored at room temperature for extended periods and can be administered to recipients regardless of blood type. A couple of acellular hemoglobin-based oxygen carriers( HBOCs )are in the final stages of clinical development<sup>1,2)</sup>. However, regulatory approval has been hampered because some serious adverse effects including severe hypertension, cardiac and other cardiovascular events have been observed in recent clinical studies<sup>3-9)</sup>. Results of these clinical trials are controversial since HBOC treatments did not significantly improve mortality rate or other clinical outcome indicators over donor red cell transfusion or standard fluid resuscitation despite some clinical benefits including improved hemodynamic status and reduction in allogeneic red cell use<sup>10-14)</sup>. Debates are ongoing as to whether the lackluster results are due to poor study design, high protocol violation rates, or an inherent

toxicity of HBOC itself. Because of HBOC's propensity to cause vasoconstriction and a higher incidence of adverse events( AEs )in HBOC treated patients than control fluid treated patients, there have been concerns that vasoconstrictive property of these products may be involved in the genesis of those AEs<sup>15,16)</sup>. Hypotheses and theories are abundant but a direct link showing HBOCs were the causative agents for the observed AEs has not been definitively established. It is clear, however, that most current acellular HBOC products do cause systemic and pulmonary BP elevations(' hypertensive 'responses )in animals and human subjects. Both human and animal Hbs have a high reactivity with endothelium derived NO, a potent vasodilator constitutively produced by the vascular endothelium to regulate vascular tone<sup>17,18)</sup>. Therefore, it is plausible that Hb scavenging of endothelial NO may contribute to the observed hypertensive/vasoactivity effects. Yet, the exact mechanism of HBOC-mediated BP elevation (hypertension )has not been fully elucidated. Other plausible mechanisms have also been proposed and it is possible that multiple mechanisms may be involved depending on clinical

( 1 ) Department of Molecular Pharmacology, Physiology and Biotechnology, Brown University, Providence, RI 02912    Department of Molecular Pharmacology, Physiology and Biotechnology Box G-B3 Brown University, 171 Meeting Street, Providence, RI 02912

( 2 ) Department of Surgery, Brown University, Providence, RI 02912

論文受付 2009年7月1日 論文受理 2009年9月26日

circumstances. A recent NIH workshop recommended more fundamental studies to delineate mechanisms of HBOC-mediated vasoactivity/BP elevation and other adverse effects<sup>19)</sup>. One encouraging finding from recent preclinical and clinical studies is that the HBOC-mediated vasoactivity/BP elevation can be modulated with the use of conventional vasodilators or anti-hypertensive agents regardless of the mechanism involved. However, little information is available regarding detailed descriptions of how these agents were used( e.g., patients' conditions, doses used, outcome or complications )nor mention of mechanisms of therapeutic action. To our knowledge, there are few published reports that have systematically reviewed and discussed use of these agents for treatment of the HBOC-mediated BP elevation. Here, we review preclinical and clinical studies that used conventional or newer anti-hypertensive agents to attenuate HBOC-mediated vasoconstriction/BP elevation and discuss potential issues.

## 2. Nature of acellular HBOC-mediated vasoconstriction and BP elevation

A recent FDA report<sup>15)</sup> states that "all current HBOC products or previously in development are vasoactive at the doses proposed for resuscitation or for blood replacement". Intravenous administration of most current acellular HBOC products to animals and humans have shown to increase systemic blood pressure without concomitant increase in the cardiac output, an indication that HBOC induced BP elevation is mediated by systemic vasoconstriction. However, the hypertensive responses do seem to vary with HBOC product characteristics([ Hb ] MW, P50, viscosity, etc ) dose/rate, and study protocol/models used<sup>19)</sup>. Generally, after HBOC infusion, BP starts to increase almost immediately, peaks within few minutes, and lasts 1-3 hours after completion of infusion depending on the dose given. The HBOC-mediated BP elevations were described as' generally mild to moderate 'and' transient 'in recent clinical trials<sup>8,20)</sup>.

In animal studies, HBOC-mediated transient hypertensive effects also varied with physico-chemical characteristics of different HBOCs, HBOC dose, species and protocols<sup>19)</sup>. Topload(hypervolemic)infusion or exchange(normovolemic) transfusion protocols produced generally more pronounced BP elevations than hemorrhagic shock-resuscitation protocols. In-vitro isometric contraction studies with isolated vascular segments revealed that vascular responses to a HBOC also varied among animal species and vessel types. For example, pig vessels were more sensitive than those of rats, rabbits and dogs<sup>21-23)</sup>. In addition, different blood vessel types even

within the same animal species elicit substantially different contractile responses to the same HBOC treatment<sup>21)</sup>. Further, for HBOC to elicit contraction, isolated thoracic aortas from rats and rabbits require precontraction with an agonist while porcine pulmonary vessels do not<sup>21,22)</sup>. At comparable HBOC doses, pulmonary vessels are generally more sensitive than other vessels. Removal of the endothelium or pretreatment with N<sup>9</sup>-nitro-L-arginine methyl ester( L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor )and certain adrenergic antagonists prevented HBOC-induced contractions<sup>22,24,25)</sup>.

In clinical studies, HBOC-mediated hypertensive effects were also observed in patients as well as healthy subjects<sup>4,8,9,14)</sup>. In a multicenter clinical trial of 688 patients with surgical anemia during orthopedic surgery<sup>8,20)</sup>, there was significantly higher incidences of adverse events associated with BP increase in patients treated with HBOC-201( Hemopure®, Biopure Corp., Cambridge, MA )compared with those treated with packed red cells: 17%( 60/350 )vs. 7%( 22/338 ) respectively. In this study, the first 500 mL( 65g Hb )infusion of HBOC-201 resulted in the largest increases in the systolic and diastolic blood pressures. After the first infusion, the mean peak SBP of HBOC-201 treated patients were 143 mmHg compared with 126 mmHg for the packed red cell ( PRBC )treated group. The mean peak systolic blood pressures( SBP )in subsequent infusions were 160 mmHg and 151 mmHg for HBOC-201 and PRBC groups, respectively. While 26% of HBOC-201 treated patients experienced peak SBP of >161 mmHg, only one patient experienced a severe BP elevation considered a severe adverse event( SAE ) However, neither the criteria for hypertensive SAE nor actual BP value of the patient was reported. In comparison, only 6% of packed red cell treated patients experienced peak SBP of >161 mmHg. All increases in BP resolved spontaneously or with treatment<sup>20)</sup>.

A phase II safety study with 250 ml or 500 ml MP4 ( Hemospan®, Sangart Corp. San Diego, CA )in elderly patients undergoing orthopedic surgery produced similar results<sup>9)</sup>; 10.2%( 6/59 )of patients who received human PEG-Hb developed hypertensive adverse events while only 3.2% ( 1/31 )of control solution( Ringer's acetate )patients did. In stroke patients, 25-100mg/Kg DCLHb( HemeAssist®, Baxter Corp., Deerfield, IL )produced a rapid rise in mean arterial pressure( MAP ) which reached a maximum within 2 hours after the first infusion<sup>4)</sup>. The authors stated that, the BP increased from 113 mmHg at baseline to 134 mmHg versus 109 mm Hg in controls. The statement is somewhat unclear but interpreted as DCLHb treatment caused significant BP

elevations while no significant BP changes in saline treated control patients during the period. The magnitude of the BP increases was similar for all HBOC doses but the duration of the pressor effect was dose dependent. The hypertensive reaction did not accompany clinical and radiological signs of cerebral pathologic changes. Three of the 40( 7.5% )patients treated with DCLHb developed severe hypertension requiring pharmacologic intervention while 3/45( 6.7% )control patients<sup>4)</sup>. Unfortunately, the report provided neither criteria of the' severe hypertension 'nor description of pharmacologic intervention used<sup>4)</sup>. In a Phase I study of 42 healthy adult male volunteers<sup>14)</sup>, 33 received 0.025- 0.6g Hb/Kg o-raffinose Hb( Hemolink®, Hemosol, Inc., Toronto, Canada ) dose-dependent MAP increases were observed with a plateau occurring 14% above the baseline at 0.1 g Hb/Kg. In patients undergoing coronary artery bypass graft( CABG ) surgery, hypertension( defined as SBP>140 mmHg )occurred in 16/28( 57.2% )o-raffinose Hb( 25-75 g Hb )treated patients versus in 9/32( 28.1% )control patients<sup>10)</sup>.

It appears that HBOC elicits a more pronounced hypertensive effects in normovolemic patients than in hypovolemic patients. In a Phase II study with patients undergoing an elective percutaneous coronary intervention procedure, 31%( 9/29 )of HBOC( 15 or 30 g Hb )treated patients developed a severe hypertension( SBP>180 mmHg ) while none of the artificial colloid treated patients( 0/16 )had hypertension reported as adverse events( AEs )<sup>9)</sup>. The severe BP elevations were treated with intravenous nitroglycerine or other unspecified anti-hypertensive drugs as necessary.

### 3. Is there an acceptable level of vasoactivity?

In most patients with no significant underlying cardiovascular pathology, HBOC-mediated BP elevations are reported to be moderate and transient and did not require therapeutic intervention while some patients who developed severe BP elevations did require pharmacologic interventions<sup>4,8,11-13,20)</sup>. For patients with severe hemorrhagic shock or ischemic stroke, the potential beneficial effect of HBOC-mediated moderate BP elevation is being debated<sup>3,26)</sup>. But individual patient's clinical condition and underlying pathologies should be carefully considered as patients with significant cardiovascular pathologies are at higher risk for hypertension induced serious adverse events( e.g., cardiac events, stroke, hemorrhage, organ damage, etc ) Therefore, if a patient is hypertensive, diabetic or elderly with significant underlying cardiovascular pathology, post-HBOC infusion BP should be carefully monitored and a proper anti-hypertensive therapy be instituted promptly if deemed necessary. Whether or

when to treat HBOC-mediated BP elevation would depend largely on the degree of BP elevation, patient's condition, the underlying pathophysiology, and the indication for HBOC. Of note, when administering antihypertensive agents to anesthetized patients, caution should be exercised as halothane and certain local anesthetics have been reported to mask HBOC mediated BP responses<sup>27)</sup>.

### 4. Key mechanisms proposed for the HBOC-mediated vasoconstriction/BP elevation

There are several proposed mechanisms for the HBOC-mediated vasoconstriction/BP elevation; the leading hypotheses are briefly discussed below.

#### Vasoconstriction via Hb scavenging of endothelial NO

Under normal conditions, NO is constitutively produced in the vascular endothelium by the action of endothelial nitric oxide synthase( eNOS or NOS-3 ) Once diffused to the smooth muscles, NO activates soluble guanylyl cyclase( sGC ) to produce elevated level of cGMP which results in smooth muscle relaxation. One popular hypothesis for the HBOC-mediated vasoconstriction and BP elevation is HBOC inactivation of endothelium derived NO, a potent vasodilator that mediates GC-cGMP dependent vascular smooth muscle relaxation. Because Hb has an intrinsically high reactivity with NO, the presence of large amounts of acellular Hb/HBOC in the vascular lumen could interrupt endothelium-derived NO flux into the smooth muscle resulting in vascular contraction. In addition, because of smaller particular size( <5-10 nm ) some HBOC particles could extravasate through the endothelial fenestrations into the subendothelial space allowing closer contact with endothelial NO. Some HBOCs are too large in particle size to pass through the fenestrations. However, acellular HBOC dissolved in the plasma is several hundred times more reactive with NO than native Hb compartmentalized in the protective red blood cells<sup>28)</sup>. In addition, only Hbs and HBOCs with ferrous hemes elicit contractions in the vessels with intact functional endothelium supporting the hypothesis<sup>24,29,30)</sup>.

#### Oxygen dependent autoregulatory vasoconstriction

It has been reported that two Hb preparations( native cell-free Hb and PEG-Hb )that have similar NO binding rates elicit notably different hemodynamic effects<sup>31)</sup>. In this study, Hb solutions that exhibited transient or no significant increase in BP had higher NO binding affinities than Hb solutions that sustained BP increases. Based on these observations, they claimed that NO scavenging at the heme site cannot be the cause of BP increases but rather must be

due to other physiologic mechanisms. They hypothesized that acellular low O<sub>2</sub> affinity (P<sub>50</sub> ~ 50) HBOCs may lead to excessive oxygen offloading in the arterioles upstream from the capillary beds causing reactive arteriolar vasoconstriction and decreased functional capillary density (O<sub>2</sub> dependent autoregulatory vasoconstriction)<sup>31-33</sup>.

#### Hb stimulation of endothelin-1 release

In preclinical and clinical studies, intravenous administration of DCLHb caused dose-dependent increases in plasma levels of endothelin-1 (ET-1) a potent vasoconstrictor<sup>34-37</sup>. The pressor response and other cardiovascular effects of DCLHb could be attenuated by pretreatment with BQ-123 and FR-139317, ETA-receptor antagonists<sup>35</sup> suggesting that the HBOC-induced vasoconstriction/BP elevation may involve stimulation of ET-1 release. Interestingly, infusion of an ultra-large molecular weight based HBOC (20 MDa) caused no systemic hypertension in animals with focal cerebral ischemia. But the cerebro-arteriolar vasoconstriction observed that was reported to be mediated primarily by ET-1<sup>38</sup>. Further, ET receptor antagonists attenuated pressor effects of DCLHb in rats<sup>39</sup>. These results suggest that ET-1 may play a more significant role in certain vascular beds and animal models<sup>36,39</sup>.

In addition, other mechanisms have also been proposed for the HBOC-mediated vasoconstriction and BP elevation including Hb stimulation of adrenergic vasoconstrictive mechanisms<sup>40</sup>, and pseudo-ACE activity of Hb<sup>41</sup>. Although one key mechanism may function as a dominant player, other mechanisms may also contribute depending on clinical conditions and underlying pathologies of the patients involved.

#### **5. Potential pharmacologic remedies for HBOC-mediated vasoconstriction and BP elevation**

In recent clinical trials, hypertensive responses following HBOC administration were described as 'mild and transient' and did not require any therapeutic intervention<sup>8,20</sup>. However, some patients did develop clinically serious post-HBOC administration hypertension serious enough to be reported as AEs/SAEs but no information is available how many of these patients actually needed treatment and, if treated, specifics of therapy given. These patients and those with serious underlying cardiovascular pathology and limited reserve capacity should be treated promptly with proper anti-hypertensive therapies. The conventional anti-hypertensive therapies for hypertensive emergencies/urgencies as defined by the Joint National Committee<sup>42</sup> should generally be

applicable to the treatment of HBOC-mediated acute BP elevations as well. In fact, HBOC-mediated critical BP elevations do seem to occur more frequently in patients with underlying conditions that tend to elicit BP elevation (e.g., essential hypertension, diabetes, renal disease)<sup>6,8</sup>. Conventional anti-hypertensive guidelines and therapies including diuretics, renin-angiotensin system antagonists, - and/or -blockers and Ca<sup>++</sup> channel blockers are viable treatment options<sup>42</sup>. As described previously, in clinical trials HBOCs typically caused an almost immediate BP rise after start of intravenous infusion. The BP rise did not generally exceed 25 mmHg above the pretreatment values even at relatively high topload (for non-hypovolemic indications) doses (e.g., 30g Hb<sup>3</sup>). However, in relatively small number of patients, the post-HBOC BP elevations were more severe (some may qualify as' hypertensive urgencies or emergencies') and were reported as hypertensive SAEs<sup>6,8,15,20</sup>. Management of HBOC-induced severe BP elevation (hypertensive emergencies or urgencies) may require faster acting intravenous agents to quickly lower the blood pressure to a safer level<sup>43</sup>. Some established anti-hypertensive therapies as well as new approaches that seem relevant to the management of HBOC-mediated BP elevation are discussed below.

Today, there are many highly effective drugs available for treatment of a chronic hypertension<sup>42</sup>. Only a couple of these agents have actually been used in HBOC clinical trials. Furthermore, virtually no study have been done systematically to study safety and effectiveness of these drugs when used for prevention or treatment of HBOC-mediated acute BP elevations even in preclinical studies. In theory, any agent that increases NO availability to the vascular smooth muscle or causes vascular relaxation through other mechanisms would be effective in modulating HBOC-mediated vasoconstriction/ BP elevation. However, selection of an appropriate therapeutic agent must be based on careful consideration of the individual patient's clinical condition, underlying pathophysiology, and potential interaction with HBOC directly or indirectly. Of note, in patients with severe hypertension, the recommended treatment objective for patients with' hypertensive emergencies 'is not immediate normalization of BP but rather to reduce BP to a more safely manageable level to prevent or minimize end-organ damage followed by gradual return to a normal level<sup>43</sup>. In patients with' hypertensive urgencies', it is recommended that BP be lowered gradually over a period of 24-48 hours, usually with oral medications. Rapid uncontrolled BP reduction may result in cerebral, myocardial

and renal ischemia/infarct<sup>44-45</sup>. Here we discuss advantages and disadvantages of some selected anti-hypertensive agents, potentially useful in the management of acute severe elevations in BP that may occur following HBOC administration.

### 5.1. Adrenergic agonists/antagonists

In studies with isolated arterial vessel segments and whole animals in-vivo, Hb/HBOC in nM ~ μM concentration range were shown to elicit vascular contraction<sup>21-24, 29</sup>. In these experiments, pretreatment with phentolamine or prazosine ( -adrenergic antagonists )prevented Hb/DCLHb-mediated contractions or pressor effect<sup>25-40</sup>. However, phentolamine pretreatment did not prevent Hb-mediated contraction in vessel rings precontracted with KCl suggesting adrenergic activation does not appear to be a pre-requisite. In cervical sectioned and bilateral adrenalectomized rats, intravenous DCLHb still caused significant systemic BP elevations<sup>40</sup>. In these animals, however, pretreatment with phenoxybenzamine and prazosin( -1 adrenergic antagonists )blocked DCLHb mediated pressor effect. In addition, the DCLHb-mediated BP increases were also blocked by yohimbine( alpha-2 adrenergic antagonist )pretreatment<sup>46</sup> suggesting that DCLHb-mediated pressor effect may be partially mediated through alpha-2 adrenergic mechanism. Alternatively, a centrally acting - adrenergic agonist (e.g., clonidine )may also be useful as it stimulates presynaptic alpha-2 receptors that results in inhibition of norepinephrine release and lower vascular tone. Clonidine is currently used for treatment of hypertensive urgencies<sup>43</sup>. Because oral clonidine lowers BP more gradually, it may be suitable for those patients that a rapid BP reduction is not necessary. Therefore, -adrenergic antagonists/agonists may be potentially useful in attenuating HBOC-mediated vasoconstriction and BP elevation. However, their use may be complicated in certain patients because adrenergic vasopressors are often used in severely hypotensive hemorrhagic patients<sup>47</sup>.

### 5.2. Nitrovasodilators

#### Organic nitrates

One strategy to alleviate HBOC-mediated vasoconstriction, is to supplement NO towards the normal level with an exogenous NO source. Nitroglycerine or glyceryl tri-nitrate ( GTN ) the most commonly used of all organic nitrates, is a potent vasodilator widely used clinically for coronary vasospasm and other conditions. Its vasodilatory mechanism has not been fully elucidated but, recently, it was reported to elicit vasodilation via NO produced by action of mitochondrial aldehyde dehydrogenase<sup>48, 49</sup> which catalyzes reduction of

GTN to generate nitrite and 1,2-glycerate dinitrate. The nitrite so generated is proposed to be further metabolized to generate NO which then elicit GC-cGMP mediated vasodilation. However, this theory has recently been challenged as GTN mediated relaxation was not observed with concomitant NO fluorescence nor inhibition of O<sub>2</sub> consumption by vascular mitochondria<sup>50</sup>. Nevertheless, GTN may be an effective therapeutic agent for modulation of the HBOC-mediated vasoconstriction and BP elevation. In rat aortic ring preparations, GTN significantly reduced acellular Hb-mediated contraction<sup>29</sup>. In a recent clinical study in patients undergoing an elective percutaneous coronary intervention procedure, critical elevations of BP( defined as SBP>180 mmHg )occurred in 31% of patients following treatment with HBOC-201<sup>6</sup>. In these patients, BP elevations were generally managed with intravenous GTN. As GTN tolerance often occurs, one patient was not responsive to GTN treatment and required nifedipine( calcium channel blocker )to control the BP.

Of note, nitrates are known to oxidize Hb creating ferric Hb or metHb and instances of intraerythrocytic methemoglobinemia following administration of GTN and other organic nitrates have been documented<sup>51</sup>. Because of the presence of large amounts of metHb-reductase( NADH-cytochrome b complex )and other reducing agents in the red blood cells of normal people, toxic levels of metHb accumulation is relatively rare. However, intravenously administered HBOCs circulate in the plasma phase where metHb reducing capacity is relatively low. Therefore, plasma metHb levels could rise more easily in patients with plasma HBOC following administration of GTN or other nitro-drugs with a high oxidation potential. In a clinical trial of surgical patients administered up to 2.0-2.5g Hb/Kg of HBOC-201 ( total of approximately 180g Hb ) metHb level was <2% at post-operative day 1 but reached a peak of approximately 7%<sup>13</sup>. In a more recent clinical study of orthopedic surgery patients, cumulative HBOC-201 doses of up to 330 g( 11 units ) were given over a 6-day period( average of 136 g Hb ) The mean metHb levels ranged 0.6%-5.8% after each infusion including two patients whose peak metHb levels reached 11% and 14% but none of the patients exhibited symptoms or required treatment<sup>8</sup>. In addition, when significant amount of metHb or ferric HBOC is formed, the total oxygen binding/carrying capacity of HBOCs is also reduced as metHb is unable to bind and carry O<sub>2</sub>. Of note, until metHb level reaches >30%, clinical symptoms may not appear. When metHb level reaches over 50%( fatal if >70% ) cardiovascular dysfunction and neurologic deficits may occur as the blood is

unable to transport sufficient O<sub>2</sub> to meet metabolic demand. In such case, methHb level can generally be reduced by administering intravenous methylene blue<sup>52)</sup>.

In addition, although GTN and other organic nitrates are useful in controlling severe hypertension in patients with cardiac ischemia, they may not be the best choice in other patients<sup>53)</sup>. GTN causes arterial as well as venodilation thus reducing preload and cardiac output. Besides, many patients develop tolerance to GTN making it less effective with repeated doses. For these drugs, optimal dosing in hemodynamically unstable patients poses significant challenges.

#### Sodium nitroprusside

Sodium nitroprusside( SNP )is a potent vasodilator often used for treatment of severe acute hypertension. However, in rats treated with clinically relevant doses( >1g/Kg )of DCLHb, potency of SNP potency was significantly reduced<sup>54)</sup> implying higher doses of SNP would be required to control severe hypertension in the presence of high levels of plasma HBOC. SNP is a potent arterial and venous vasodilator and intravenous administration is the clinical treatment of acute hypertension or for hypertensive crisis( defined as SBP>160 mmHg or DBP>110 mmHg )<sup>43)</sup>. Its pharmacologic action is thought to be due to spontaneous degradation to release NO in the blood. But recent reports suggest that it, too, may go through biotransformation in the vascular smooth muscle and endothelial cells to produce NO<sup>55,56)</sup>.

Of note, when treating HBOC-mediated BP elevation with SNP, caution should be exercised since SNP releases highly toxic cyanide ions( CN<sup>-</sup> )causing potentially lethal cyanide poisoning. Thus, the maximal dose should generally not exceed normal hepatic cyanide clearance rate of 2 $\mu$ g/kg/min<sup>57)</sup>. Small amount of cyanide in the blood is rapidly metabolized by the liver to less harmful thiocyanate by the action of the enzyme *rhodanase*( requires sulfur donor such as thiosulfate ) Thiocyanate is then excreted in the urine by the kidney. However, in the absence of sufficient sulfur donor, cyanide ions could quickly reach toxic levels( >1 mg/ml ) Thus, the duration of treatment should generally not exceed 72 hours and plasma thiocyanate concentrations should be carefully monitored. SNP also degrades upon exposure to light to produce cyanide. In patients with renal failure or patients with a deficiency in rhodanase enzyme or low sulfur donor levels, SNP should not be used as it could cause fatal cyanide poisoning.

#### 5.3. Ca<sup>2+</sup>-channel blockers

Calcium channel blockers are commonly used anti-hypertensive drugs which generally reduce cardiac and vascular smooth muscle cytosolic Ca<sup>2+</sup> leading to decreased cardiac output and vasodilation. The Ca<sup>2+</sup>-channel blockers are further classified into dihydropyridines( e.g., nicardipine, nifedipine ), phenylalkylamines( e.g., verapamil ) and benzothiazepines( e.g., diltiazem ) With exception of few, most of Ca<sup>2+</sup>-channel blockers are typically formulated to be administered orally due to low water solubility. For management of acute severe HBOC-mediated BP elevation, fast acting intravenous or sublingual formulations would be more desirable. In fact, a recent Phase II study of HBOC-201 reported that intravenous administration of nifedipine successfully controlled critical hypertension( >180 mmHg ) which did not respond to an intravenous nitroglycerine<sup>58)</sup>.

In a study with awake spontaneous hypertensive rats, 10% topload infusion of o-raffinose Hb resulted in significant increase in MAP( 36 mmHg )at 10 minutes after the start of infusion. In these animals, pretreatment with 10 mg/kg nifedipine by gavage reduced subsequent MAP rise by 50%<sup>58)</sup>. Similarly, in anesthetized rats, DCLHb induced pressor effect was significantly inhibited by nimodipine and verapamil<sup>59)</sup>. However, the bradycardiac effect of DCLHb was not affected by nimodipine. These results suggest that treatment with Ca<sup>2+</sup>-channel blockers may prevent/modulate HBOC-mediated hemodynamic effects.

#### 5.4. Angiotension converting enzyme inhibitors and angiotension-II receptor blockers

The renin-angiotension system is a powerful endocrine blood pressure regulating mechanism. When BP is low, kidneys produce renin that activates angiotension-I production from inactive angiotensinogen. By action of an angiotension converting enzyme( ACE )angiotension-I is then converted to angiotension-II, a potent vasoconstrictor. ACE inhibitors ( ACEIs )block production of angiotension-II thereby effectively reduce BP. Currently, ACEIs are one of the major categories of drugs used for treatment of hypertension<sup>60)</sup>. Interestingly, a recent study reports that cell-free Hb exerts an ACE-like activity when activated by plasma hydrogen peroxide<sup>41)</sup>. The assertion was based on the observation that angiotension-I was converted to angiotension-II in the presence of cell-free Hb. If confirmed, this mechanism may also contribute to the Hb-mediated vasoconstrictive effect. Therefore, drugs that prevent or antagonize the action of rennin-angiotensin system including ACEIs and angiotensin-II receptor blockers( ARBs )may potentially be useful in

modulating the HBOC-mediated BP elevation. Use of ACEIs is generally recommended in patients with compromised renal function but some new data seems to indicate that ACEI may elicit end-stage renal failure<sup>61-63</sup>.

### 5.5. Phosphodiesterase inhibitors

Phosphodiesterases (PDEs) breakdown second messenger cyclic nucleotides, cGMP and cAMP which are ubiquitous in virtually all cells and are involved in many different functions including vascular smooth muscle relaxation. Therefore, non-specific PDE inhibitors (PDEIs) have not generally been used in the treatment of hypertension per se. Nevertheless, some PDEIs including a recently discovered highly selective PDEI (e.g., sildenafil) have shown to reduce HBOC-mediated vasoconstriction/hypertensive effects.

#### Sildenafil

Sildenafil is a PDE-5 selective inhibitor (PDE5I) that prevents degradation of cGMP in the corpus cavernosum and is currently used primarily as remedies for erectile dysfunction. But they also lower systemic and pulmonary hypertension making them potentially useful in modulating HBOC-mediated hypertensive responses. In fact, results of a recent animal study seem to indicate that HBOC-mediated negative vascular responses can largely be overcome by concomitant PDE5I treatment<sup>64</sup>.

#### Papaverine

Papaverine is an opium alkaloid used for treatment of gastrointestinal, cerebral and coronary vasospasms. The vascular relaxation mechanism of papaverine action has not been fully elucidated but is generally considered to act via nonspecific inhibition of cAMP-phodiesterase. In an in-vitro experiment, papaverine significantly attenuated or reversed Hb-induced contractions of isolated rat thoracic aortic ring preparations<sup>24</sup>. These results suggest that some selective PDE inhibitors may have potential in attenuating or reversing HBOC-mediated vasoconstriction/BP elevation but further studies are needed to evaluate their safety and efficacy.

### 5.6. Sodium nitrite

Substantial plasma nitrite levels have been reported in the plasma of healthy individuals (values for brachial artery and antecubital vein: 322-540 nM and 305-466 nM, respectively)<sup>65,66</sup>. Therefore, nitrites are considered as a possible endogenous NO reservoir for blood flow regulation and other functions<sup>67</sup>. Mechanisms for the in-vivo conversion of nitrite to NO have been proposed. Recently, deoxyhemoglobin is proposed to

serve as a nitrite reductase under hypoxic conditions<sup>68</sup>. To test the hypothesis, 18 normal subjects were infused with up to 1 mmoles of sodium nitrite over about a 30 minute period into the forearm brachial arteries which resulted in a systemic concentration of 16 µM. Infusion of nitrite caused an immediate increase in forearm blood flow by 175% and concomitant reduction in the systemic BP of ~ 7 mmHg<sup>68</sup>. This reduction in BP occurred with rapid formation of iron-nitrosyl Hb and, to a lesser extent, S-nitroso Hb in the blood. MetHb levels increased significantly from the baseline but still remained relatively low (from ~ 0.2% to ~ 0.5%). In a more recent study<sup>69</sup>, 20 normal human volunteers were given intravenous sodium nitrite to determine endocrine effect, pharmacokinetics, and tolerance. In this study, the highest dose given was 110 µg/kg/min which resulted in whole blood nitrite concentration of ~ 850-900 µM. Forearm blood flow increased in a dose dependent manner from 2.8 to 12.3 ml/min/100ml tissue and plateaued at around 300 µM nitrite. Plasma nitrite concentration increased from 0.13 to 26.1 µM with mean clearance of 0.95 L/min ( $T_{1/2}=42$  min). Plasma nitrate concentration increased from 18 to 64 µM with  $T_{1/2}$  of 6 hours. Systemic nitrosyl Hb levels increased from 0.14 to 7.9 µM with apparent  $T_{1/2}$  of 53 minutes. These changes were coincided with decrease in MAP from 97 to 86 mmHg with a slight but nonsignificant increase in the heart rate (68-76 beats per minute). Of note, the MAP remained significantly lower than baseline for 2 hours after the nitrite infusion was completed. Whole blood metHb levels increased from 0.7 to 3.2 % of total Hb. The highest metHb level was reached 20 minutes after completion of nitrite infusion with  $T_{1/2}$  of 78 minutes.

In a recent Phase I/II clinical trials, patients with sickle cell disease<sup>70</sup> were given 3.2-320 µmoles of sodium nitrite administered through the brachial arterial line (1 ml/minute of 0.4-40 µM sodium nitrite over about 8 minutes) which resulted in 7.9-77% increase in forearm blood flow but without significant drop in systemic BP. Dose dependent metHb increases were observed following nitrite infusion reaching peak regional venous concentration of 4% at the highest dose tested (40 µM). Aside from nausea in one patient, none of the patients exhibited ill-effects including clinical signs of hypoxia such as cyanosis or shortness of breath. However, all of the metHb levels reported were concentrations within the erythrocyte compartment not in the plasma. In normal erythrocytes, metHb is constantly reduced by action of intracellular reductases. Intravenously administered acellular HBOCs circulate in the plasma phase where metHb reduction activity is relatively low. Therefore, presence of high level of

nitrite would facilitate conversion of ferrous HBOC to non-oxygen carrying ferric HBOC( metHBOC ) In fact, for this reason, sodium nitrite is a FDA approved treatment for a cyanide poisoning as it produces metHb that neutralizes toxic cyanide ion by forming a non-toxic cyanometHb<sup>71</sup>). If substantial amount of HBOC is converted to metHBOC by nitrite, however, oxygen carrying capacity of HBOC will be reduced accordingly raising the possibility of insufficient oxygen supply despite vasodilation and improved blood flow. In addition, optimal dosing of nitrite would be extremely challenging especially in patients with significant underlying pathologies. In a more recent animal study<sup>72</sup>, a single bolus 30-100 nmol sodium nitrite( resultant blood nitrite level= 1.2  $\mu\text{M}$  )at the onset of HBOC-201 resuscitation following trauma-hemorrhage prevented HBOC-201-mediated hypertension while resuscitation with nitrite plus Ringer's lactate did not alter mean arterial pressure suggesting a possible role of HBOC-201 as a nitrite reductase. It was reported that nitrite doses of <100 nmol did not significantly increase plasma metHb level beyond that observed with HBOC-201 alone( 2-3% at 2 hr post-resuscitation ) Based on these findings, nitrite has been proposed as a potential adjunctive therapy to prevent HBOC-mediated hypertension<sup>72</sup>. Of note, however, 10  $\mu\text{mol}$  nitrite did increase metHb level beyond that observed with HBOC-201 alone while 100  $\mu\text{mol}$  caused death during resuscitation. The cause of death was not described but possibly due to severe systemic hypotension. Further, in a study with healthy human volunteers, infusion of 180  $\mu\text{mol}$  of sodium nitrite alone ( measured systemic blood nitrite concentration, 16  $\mu\text{M}$  ) caused a decrease in systemic MBP of only ~ 7 mmHg<sup>68</sup>. At this nitrite concentration without HBOC, measured serum metHb level was approximately 1.5%. Therefore, in the presence of a HBOC, a substantially higher dose of nitrite must be used to prevent/attenuate severe HBOC-induced BP elevations( BP> 60 mmHg )observed in some recent clinical trials<sup>6,8,20</sup>. Under such conditions, a much higher HBOC oxidation( metHb formation )may occur. Therefore, clinical efficacy and safety of nitrite therapy will have to be determined in human studies. In addition, the intravascular oxidation rate of acellular Hb/HBOC in humans may be higher than that observed in mice since humans are incapable of producing endogenous ascorbic acid, an important anti-oxidant that contributes to maintaining Hb in the functional ferrous state<sup>73</sup>. Unlike rats and mice, humans are unable to produce endogenous ascorbic acid due to evolutionary loss of hepatic L-gulonolactone oxidase.

Alternatively, sodium nitrite can also be administered via

inhalation. In a recent study of newborn lambs with hypoxic pulmonary hypertension, aerosolized sodium nitrite was administered through a ventilator( 30 mg nitrite in 5 ml buffered saline over 20 min )<sup>4</sup>. Nebulized nitrite inhalation elicited a rapid and sustained reduction in pulmonary pressure without measurable changes in the systemic blood pressure. Interestingly, it was reported that this means of nitrite delivery did not cause clinically significant increase in blood metHb levels. Immediate detection of NO in the exhaled gas and nitrosyl Hb formation in the blood supports the hypothesis that the pulmonary vasodilation was effected by NO produced possibly through nitrite reduction. If validated, this mode of nitrite delivery may be particularly useful in attenuating HBOC-mediated pulmonary hypertension.

## 5.7. Inhaled NO

Inhalation of gaseous NO has been reported to be effective in the treatment of persistent pulmonary hypertension as this mode of administration preferentially delivers NO to the pulmonary circuit eliciting selective pulmonary vasodilation<sup>74-77</sup>. To test whether inhalation of NO modulates the hypertensive effects of HBOC, animals were subjected to breathe low doses of NO( iNO, 5-80 ppm )before or during the HBOC administration. In anesthetized pigs, pulmonary hypertension elicited by 200 mg/kg 10% - crosslinked Hb was counteracted by repeated low doses of inhaled NO( 5 ppm x 10min + 10 min rest + 10 ppm x 10min )<sup>78</sup>. However, more recent studies indicate that longer exposure and/or higher dose of iNO may also have extra-pulmonary effect as NO is known to form S-nitroso compounds with variety of proteins under normal and pathologic conditions<sup>79</sup>. In anesthetized dogs, continuous inhalation of 80 ppm NO prevented systemic vasoconstriction elicited by cell-free plasma hemoglobin( as a result of intravascular hemolysis )released by intravenous water administration<sup>80</sup>. However, Hb administration while continuous breathing of NO caused high rate of plasma Hb oxidation to methemoglobin which has much lower reactivity with NO. Therefore, significant metHb formation in this study might also have contributed to the absence of vasoconstriction. Of note, metHb does not bind O<sub>2</sub> as well as NO making it an ineffective oxygen carrier. Interestingly, in a recent study with awake mice and lambs, pretreatment with 80 ppm iNO for 15 minutes or 200 ppm for 7 minutes prevented acellular Hb or HBOC-201 mediated systemic hypertension without significant increase in metHb levels<sup>81</sup>. If validated, this mode of NO administration may be useful in modulating HBOC-mediated pulmonary and systemic BP elevation in patients undergoing scheduled surgical

operations and elective ischemic rescue procedures. However, in patients undergoing emergency surgeries or in severe hypovolemic shock out of hospital, pretreatment with iNO before HBOC administration may not be practical. Nonetheless, inhalation of NO should be investigated further for their safety and effectiveness in modulating HBOC-mediated pulmonary and systemic BP elevation.

## 6. Issues in the use of nitrovasodilators, nitrates, and iNO/ nebulized nitrates with HBOC

Rodriguez, et al<sup>72</sup>) recently proposed that the HBOC-mediated hypertension/vasoconstriction can be modulated by co-administration of HBOC with sodium nitrite based on the theory that Hb also possesses nitrite reductase activity thereby reducing nitrite into vasodilating NO as discussed above. However, there are also problems with this approach. First, because of very high affinity of NO to ferrous heme-iron( 10<sup>7</sup>/M/sec ) the liberated NO will be captured immediately by the deoxyHb limiting its availability to smooth muscle cells where NO mediates vascular relaxation via the GC-cGMP mediated mechanism. Second, nitrite is a known Hb oxidant that could convert both erythrocytic and acellular Hbs to non-oxygen carrying ferric metHb<sup>51,80</sup>). Acellular HBOCs in the plasma phase are particularly susceptible to oxidation lacking anti-oxidant enzymes normally present in red blood cells. If the extent of HBOC oxidation is significant, the oxygen carrying capacity of the infused HBOC will be proportionately reduced thus potentially compromising its intended efficacy.

Of note, because organic nitrovasodilators, nitrates and iNO are known oxidizers of Hb, metHb levels must carefully be monitored. In patients who are highly hemodiluted with a HBOC, a clinically significant level of plasma metHb/methHBOC may lead to insufficient oxygen delivery to tissues. If clinical signs of hypoxia are present, intravenous administration of Hb reducing agent such as methylene blue should be considered<sup>52</sup>.

In addition to the pharmacologic agents discussed above, there are numerous other highly effective antihypertensive agents that are potentially useful in preventing/attenuating the HBOC-mediated BP elevations( e.g., K<sup>+</sup>-channel openers, hydralazine, pentoxyphilline and others ) However, they have never been tested in the modulation of HBOC-mediated BP elevation and need to be investigated. Some desired characteristics of an ideal anti-hypertensive agent for use in prevention or treatment of HBOC-induced BP elevation include a rapid therapeutic action, low tendency to develop

tolerance and a low HBOC oxidation potential, and a wide margin of safety.

## 7. Conclusions

Most acellular Hb based HBOCs appear to cause vasoconstriction and BP elevation. Although relatively rare, HBOC-induced severe BP elevation( SBP>180 mmHg ) requires prompt intervention to minimize consequences especially in patients who are diabetic, hypertensive or with other serious underlying cardiovascular pathologies. The mechanism(s )for HBOC-mediated vasoconstriction and BP elevation has not been fully elucidated. Regardless of mechanisms, however, HBOC-mediated vasoconstriction and BP elevation appears to be manageable by various conventional and new pharmacologic agents including nitrovasodilators, adrenergic receptor blockers, calcium channel blockers, ACE inhibitors, PDE inhibitors and inhaled NO gas. Whether and when to treat HBOC-mediated BP elevation and the selection of appropriate anti-hypertensive therapy may be debated but must be based on individual patient's clinical condition, medical history, and underlying pathology. In addition, because titration of HBOC-mediated BP elevation could be very challenging in hemodynamically unstable patients, pharmacologic anti-hypertensive treatment should only be performed in settings where sophisticated vital sign monitoring/resuscitation resources are available. In conclusion, HBOC-mediated vasoactivity and hypertensive response may be manageable by use of selected conventional anti-hypertensive pharmacologic agents along with some new emerging vasodilatory therapeutics. However, very little information is available regarding safety and effectiveness of these approaches. For the current leading HBOC products to move forward through the regulatory approval, it would be worthwhile to explore these approaches to prevent or attenuate HBOC-induced adverse vasoactivities.

## References

1. Kim HW and Greenburg AG. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status. *Artif Organs* 2004; 28: 819-828.
2. Kocian R and Spahn DR. Haemoglobin, oxygen carriers and perioperative organ perfusion *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2008; 22: 63-80.
3. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, Rodman G Jr. Diaspirin cross-linked hemoglobin( DCLHb )in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *JAMA* 1999; 282: 1857-1864.
4. Saxena R, Wijnhoud AD, Carton H, Hacke W, Kaste M,

- Przybelski RJ, Stern KN, Koudstaal PJ. Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier, DCLHb, in acute ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30: 993-996.
5. Greenburg AG, Kim HW, and Hemolink Study Group. "Use of an oxygen therapeutic as an adjunct to intraoperative autologous donation to reduce transfusion requirements in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 373-383.
  6. Serruys PW, Vranckx P, Slagboom T, Regar E, Meliga E, De Winter R, Heydrickx G, Schuler G, van Remortel EA, Dube GP, Symons J. Haemodynamic effects, safety, and tolerability of haemoglobin-based oxygen carrier-201 in patients undergoing PCI for CAD. *EuroIntervention* 2008; 3: 600-609.
  7. Moore EE, Moore FA, Fabian TC, Bernard AC, Fulda GJ, Hoyt DB, Duane TM, Weireter LJ Jr, Gomez GA, Cipolle MD, Rodman GH Jr, Malangoni MA, Hides GA, Omert LA, Gould SA, PolyHeme Study Group. Human polymerized hemoglobin for the treatment of hemorrhagic shock when blood is unavailable: the USA multicenter trial. *J Am Coll Surg* 2009; 208: 1-13.
  8. Jahr JS, Mackenzie C, Pearce LB, Pitman A and Greenburg AG. HBOC-201 as an alternative to blood transfusion: efficacy and safety evaluation in a multicenter phase III trial in elective orthopedic surgery. *J Trauma* 2008; 64: 1484 -1497.
  9. Olofsson C, Ahl T, Johansson T, Larsson S, Nellga P, Ponzer S, Fagrel BI, Przybelski R, Keipert P, Winslow N, Winslow RM. A multi-center clinical study of the safety and activity of maleimide-polyethylene glycol hemoglobin (Hemospan®) in patients undergoing major orthopedic surgery. *Anesthesiology* 2006; 105: 1153-1163.
  10. Hill SE, Gottschalk LI, and Grichnik K. Safety and preliminary efficacy of hemoglobin raffiner for patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2002; 16: 695-702.
  11. Kasper SM, Walter M, Grüne F, Bischoff A, Erasmi H, Buzello W. Effects of a hemoglobin-based oxygen Carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg* 1996; 83: 921-927.
  12. Glenn M, LaMuraglia, MD, Patrick J. O'Hara, MD, William H. The reduction of the allogeneic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution. *J Vasc Surg* 2000; 31: 299-308.
  13. Sprung J, Kindscher JD, Wahr JA, Levy JH, Monk TG, Moritz MW, O'Hara PJ. The use of bovine hemoglobin Glutamer-250( Hemopure®)in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Anesth Analg* 2002; 94: 799-808.
  14. Carmichael FJ, Ali AC, Campbell JA, Langlois SF, Biro GP, Willan AR, Pierce CH, Greenburg AG. A phase I study of o-raffinose cross-linked human hemoglobin. *Crit Care Med* 2000; 28: 2283-2292.
  15. Silverman T, Landow L, Ko HS, and Lindsey K. Review of publicly available reports of adverse events associated with HBOCs. <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/NewsEvents/WorkshopsMeetingsConferences/ucm092845.pdf> (last accessed Sept 2009 )
  16. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta analysis. *JAMA* 2008; 299: 2304-2312.
  17. Martin W, Gina M, Jothianandan D, and Furchtgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glycetyl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 708-716.
  18. Martin W, Smith JA, White DG. The mechanisms by which hemoglobin inhibits the relaxation of rabbit aorta induced by nitrovasodilators, nitric oxide, or bovine retractor penis inhibitory factor. *Br J Pharmacol* 1986; 89: 563-571.
  19. Estep T, Bucci E, Farmer M, Greenburg G, Harrington J, Kim HW, Klein H, Mitchell P, Nemo G, Olsen K, Palmer A, Valeri CR, Winslow R. Basic science focus on blood substitutes: a summary of the NHLBI Division of Blood Diseases and Resources Working Group Workshop, March 1, 2006. *Transfusion* 2008; 48: 776-782.
  20. Freilich D, Pearce LB, Pitman A, Greenburg G, Berzins M, Bebris L, Ahlers S and McCarron R. HBOC-201 Vasoactivity in a phase III clinical trial in orthopedic surgery subjects-extrapolation of potential risk for acute trauma trials. *J Trauma* 2009; 66: 365-376.
  21. Freas W, Llave R, Jing M, Hart J, McQuillan P, Muldoon S. Contractile effects of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) on isolated porcine blood vessels. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 762-767.
  22. Muldoon SM, Ledvina MA, Hart JL, Macdonald VW. Hemoglobin-induced contraction of pig pulmonary veins. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 579-584.
  23. Hart JL, Ledvina MA, Muldoon SM. Actions of diaspirin cross-linked hemoglobin on isolated rat and dog vessels. *J Lab Clin Med* 1997; 129: 356-363.
  24. Kim HW and Greenburg AG. Ferrous hemoglobin scavenging of endothelium derived nitric oxide is a

- principal mechanism for hemoglobin mediated vasoactivities in isolated rat thoracic aorta. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1997; 25: 121-133.
25. Kim HW, Tai J, Greenburg AG. Alpha adrenergic activation and hemoglobin mediated contraction in the isolated rat thoracic aorta. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001; 29: 367-380.
  26. Mistri AK, Robinson TG, Potter JF. Pressor therapy in acute ischemic stroke: systematic review. *Stroke* 2006; 37: 1565-1571.
  27. Bone HG, Waurick R, Van Aken H, Jahn UR, Booke M, Meyer J. The hemodynamic effects of cell-free hemoglobin during general and epidural anesthesia. *Anesth Analg* 1999; 89: 1131-1136.
  28. Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 707-717.
  29. Kim HW and Greenburg AG. Pharmacodynamic characterization of hemoglobin-induced vasoactivity in isolated rat thoracic aorta. *J Lab Clin Med* 2000; 135: 180-187.
  30. Pawson P, Gibson IF, Dowell FJ. The effect of the polymerized bovine haemoglobin solution, Hb-200, on endothelial function in isolated arterial rings from rats. *J Vet Pharmacol Ther* 2007; 30: 556-563.
  31. Rohlfs RJ, Bruner E, Chiu A, Gonzales A, Gonzales ML, Magde D, Magde MD Jr, Vandegriff KD, Winslow RM. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J Biol Chem* 1998; 273: 12128-12134.
  32. Vandegriff KD and Winslow RM. Hemospan: design principles for a new class of oxygen therapeutic. *Artif Organs* 2009; 33: 133-138.
  33. Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, Lohman J, and Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003; 43: 509-516.
  34. Gulati A, Singh G, Rebello S, Sharma AC. Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci* 1995; 56: 1433-42.
  35. Gulati A, Sharma AC, Singh G. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit Care Med* 1996; 24: 137-147.
  36. Gulati A, Sen AP, Sharma AC, and Singh G. Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997; 273: H827-H836.
  37. Saxena R, Wijnhoud AD, Man in 't Veld AJ, van den Meiracker AH, Boomsma F, Przybelski RJ, Koudstaal PJ. Effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on endothelin-1 and blood pressure in acute ischemic stroke in man. *J Hypertens* 1998; 16: 1459-1465.
  38. Cao S, Wang LC, Kwansa H, Roman RJ, Harder DR, Koehler RC. Endothelin rather than 20-HETE contributes to loss of pial arteriolar dilation during focal cerebral ischemia with and without polymeric hemoglobin transfusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: R1412-1418.
  39. Rioux F, Harvey N, Moisan S, Larivière R, Lebel M, Grose JH, Burhop K. Nonpeptide endothelin receptor antagonist attenuate the pressor effect of diaspirin-crosslinked hemoglobin in rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77: 188-194.
  40. Gulati A, Rebello S. Role of adrenergic mechanisms in the pressor effect of diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 125-133.
  41. Simoni J, Simoni G, Moeller JF, Tsikouris JP, Wesson DE. Evaluation of angiotensin converting enzyme( ACE )like activity of acellular hemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; 35: 191-210.
  42. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC7 report. *JAMA* 2003; 289: 2560-2572.
  43. Varon J, and Marik PE. The diagnosis and management of hypertensive crises. *Chest* 2000; 118: 214-227.
  44. Prisant LM, Carr AA, Hawkins DW. Treating hypertensive emergencies. Controlled reduction of blood pressure and protection of target organs. *Postgrad Med* 1993; 93: 92-110.
  45. Ziegler MG. Advances in the acute therapy of hypertension. *Crit Care Med* 1992; 20: 1630-1631.
  46. Sharma AC, Gulati A. Yohimbine modulates diaspirin crosslinked hemoglobin-induced systemic hemodynamics and regional circulatory effects. *Crit Care Med* 1995; 23: 874-84.
  47. Herget-Rosenthal S, Saner F, Chawla LS. Approach to hemodynamic shock and vasopressors. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 546-553.
  48. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8306-8311.

49. Chen Z, Stamler JS. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16: 259-265.
50. Nunez C, Victor VM, Tur R, Alvarez-Barrientos A, Moncada S, Espulges JV, D'Ocon P. Discrepancies between nitroglycerin and NO-releasing drugs on mitochondrial oxygen consumption, vasoactivity, and the release of NO. *Circ Res* 2005; 97: 1063-1069.
51. Coleman MD, Coleman NA. Drug-induced methaemoglobinemia. Treatment issues. *Drug Saf* 1996; 14: 394-405.
52. Clifton J 2nd, Leikin JB. Methylene blue. *Am J Ther* 2003; 10: 289-291.
53. Bussmann WD, Kenedi P, von Mengden HJ, Nast HP, Rachor N. Comparison of nitroglycerin with nifedipine in patients with hypertensive crisis or severe hypertension. *Clin Investig* 1992; 70: 1085-1088.
54. Erhart SM, Cole DJ, Patel PM, Drummond JC, Burhop KE. Effect of alpha-alpha diaspisin crosslinked hemoglobin (DCLHb) on the potency of sodium nitroprusside and nitroglycerine to decrease blood pressure in rats: a dose-response study. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000; 28: 385-396.
55. Kowaluk EA, Seth P, Fung HL. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262: 916-922.
56. Aldini G, Pirrone F, Albertini M, Orioli M, Piccoli A, Mazzola S, Clement MG, and Carini M. Electron spin resonance and chemiluminescence analyses to elucidate the vasodilating mechanism of sodium nitroprusside. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1672-1680.
57. Friederich JA, Butterworth JF 4th. Sodium nitroprusside: twenty years and counting. *Anesth Analg* 1995; 81: 152-162.
58. Ning J, Wong LT, Christoff B, Carmichael FJ, Biro GP. Haemodynamic response following a 10% topload infusion of Hemolink™ in conscious, anaesthetized and treated spontaneously hypertensive rats. *Transfus Med* 2000; 10: 13-22.
59. Rioux F, St-Pierre M, Harvey N, Moisan S, Burhop KE, Drapeau G. Nimodipine inhibits the pressor activity of diaspisin-crosslinked hemoglobin (DCLHb) in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 983-988.
60. Matchar DB, McCrory DC, Orlando LA, Patel MR, Patel UD, Patwardhan MB, Powers B, Samsa GP, Gray RN. Systematic review: comparative effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers for treating essential hypertension. *Ann Intern Med* 2008; 148: 16-29.
61. Khan NA, Hemmelgarn B, Herman RJ, Bell CM, Mahon JL, Leiter LA, Rabkin SW, Hill MD, Padwal R, Touyz RM, Laroche P, Feldman RD, Schiffrian EL, Campbell NR, Moe G, Prasad R, Arnold MO, Campbell TS, Milot A, Stone JA, Jones C, Ogilvie RI, Hamet P, Fodor G, Carruthers G, Burns KD, Ruzicka M, DeChamplain J, Pylypczuk G, Petrella R, Boulanger JM, Trudeau L, Hegele RA, Woo V, McFarlane P, Vallée M, Howlett J, Bacon SL, Lindsay P, Gilbert RE, Lewanczuk RZ, Tobe S; Canadian Hypertension Education Program. The 2009 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: Part 2-therapy. *Can J Cardiol* 2009; 25: 287-298.
62. Woo KT, Lau YK, Wong KS, Chan CM. ACE inhibitor use and the long-term risk of renal failure in diabetics. *Kidney Int* 2006; 70: 1376-1377.
63. Suissa S, Hutchinson T, Brophy JM, Kezouh A. ACE-inhibitor use and the long-term risk of renal failure in diabetes. *Kidney Int* 2006; 69: 913-919.
64. Gotshall RW, Hamilton KL, Foreman B, van Patot MC, Irwin DC. Glutaraldehyde-polymerized bovine hemoglobin and phosphodiesterase-5 inhibition. *Crit Care Med* 2009; 37: 1988-1993.
65. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon RO 3rd. Role of circulating nitrites and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11482-11487.
66. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12814-12819.
67. Gladwin MT, Raat NJ, Shiva S, Dezfulian C, Hogg N, Kim-Shapiro DB, Patel RP. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2026-H2035.
68. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO 3rd, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 2003; 9: 1498-1505.
69. Dejam A, Hunter CJ, Tremonti C, Pluta RM, Hon YY, Grimes G, Partovi K, Pelletier MM, Oldfield EH, Cannon RO 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation. *Circulation* 2007; 116: 1821-1831.

70. Mack AK, McGowan Li VR, Tremonti CK, Ackah D, Barnett C, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Sodium nitrite promotes regional blood flow in patients with sickle cell disease: a phase I/II study. *Br J Haematol* 2008; 142: 971-978.
71. Baud FJ. Cyanide: critical issues in diagnosis and treatment. *Hum Exp Toxicol* 2007; 26: 191-201.
72. Rodriguez C, Vitturi DA, He J, Vandromme M, Brandon A, Hutchings A, Rue LW 3rd, Kerby JD, Patel RP. Sodium nitrite therapy attenuates hypertensive effects of HBOC-201 via nitrite reduction. *Biochem J* 2009; 422: 423-32
73. Buehler PW, D'Agnillo F, Hoffman F and Abdu I. Alayash. Effects of endogenous ascorbate on oxidation, oxygenation, and toxicokinetics of cell-free modified hemoglobin after exchange transfusion in rat and guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 49-60.
74. Hunter CJ, Dejam A, Blood AB, Shields H, Kim-Shapiro DB, Machado RF, Tarekegn S, Mulla N, Hopper AO, Schechter AN, Power GG, Gladwin MT. Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator. *Nat Med* 2004; 10: 1122-1127.
75. Romand, J-A, Pinsky MR, Firestone L, Zar HA, Lancaster JR, Jr. Effect of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics after acute lung injury in dogs. *J Appl Physiol* 1994; 76: 1356-1362.
76. Sefton W, Muldoon S. Inhaled nitric oxide attenuates increased pulmonary artery pressure following diaspirin crosslinked hemoglobin(DCLHB) administration. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1999; 27: 203-213.
77. Bloch KD, Ichinose F, Roberts JD Jr, Zapol WM. Inhaled NO as a therapeutic agent. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 339-348.
78. Figueiredo LF, Mathru M, Jones JR, Solanki D, Kramer GC. Inhaled nitric oxide reverses cell-free hemoglobin-induced pulmonary hypertension and decreased lung compliance. Preliminary results. *Crit Care* 1997; 1: 111-116.
79. Gow AJ. The biological chemistry of nitric oxide as it pertains to the extrapulmonary effects of inhaled nitric oxide. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 150-152.
80. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, Yuen PS, Star RA, Banks SM, Schechter AN, Natanson C, Gladwin MT, Solomon SB. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 2005; 115: 3409-3417.
81. Yu B, Raher MJ, Volpato GP, Bloch KD, Ichinose F, Zapol WM. Inhaled nitric oxide enables artificial blood transfusion without hypertension. *Circulation* 2008; 117: 1982-1990.

# 水中で二原子分子（O<sub>2</sub>，CO，NO）を捕捉する完全合成化合物

## Completely Synthetic Compounds That Bind Diatomic Molecules (O<sub>2</sub>, CO, NO) in Aqueous Solution

北岸 宏亮，加納 航治

Hiroaki Kitagishi, Koji Kano

### 和文抄録

ミオグロビンの酸素結合機能を人工的に再現する試みは古くから行われてきたが、これまでに合成された酸素捕捉剤は厳密に脱水された有機溶媒中で機能するものがほとんどであり、水が存在する系で酸素を結合させることは非常に困難であった。我々は近年、環状オリゴ糖である heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)-cyclodextrin (TMe-CD) が水中でテトラアリールポルフィリンの周辺に強い疎水場を提供するという性質に着目し、水中で機能するミオグロビンモデルの合成を試みた。TMe-CD の包接によって Fe<sup>II</sup> ポルフィリンを周辺の水から隔離しつつ、中心金属の Fe<sup>II</sup> を酸素結合が可能な 5 配位状態とするために、ピリジンもしくはイミダゾール配位子を含むリンカーによって 2 つの TMe-CD を連結したシクロデキストリン二量体 (Py3CD, Py2CD, ImCD) を合成した。これらの二量体はいずれも水中において [5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphinato]iron(II) (Fe<sup>II</sup>TPPS) を非常に強く包接し、かつその中心の Fe<sup>II</sup> へはリンカーの塩基が第 5 配位子として配位するため、水中で可逆的な酸素結合が可能であった。それぞれの包接錯体における酸素親和性および自動酸化（メト化）によるオキシ体の分解に対する半減期は pH 7.0 のリン酸緩衝液中 25 °C において、Py3CD-Fe<sup>II</sup>TPPS 錯体 (hemoCD1):  $P_{1/2}^{O_2} = 17$  Torr,  $t_{1/2} = 30$  h, Py2CD-Fe<sup>II</sup>TPPS 錯体 (hemoCD2):  $P_{1/2}^{O_2} = 176$  Torr,  $t_{1/2} > 100$  h, ImCD-Fe<sup>II</sup>TPPS 錯体 (hemoCD3):  $P_{1/2}^{O_2} = 1.7$  Torr,  $t_{1/2} = 3$  h となった。また、hemoCD1 は一酸化炭素 (CO) と非常に強く結合する性質を示したが、一酸化窒素 (NO) に対しては不安定で hemoCD1 の分解が起こった。一方、hemoCD2 は CO および NO と水中で安定な付加体を形成した。MM2 計算から推定される hemoCD1-3 の分子構造から、水中で安定な酸素付加体を生成するためには、ポルフィリンの Fe<sup>II</sup> 中心への水の接触を厳密に遮断することが重要であるという結論が得られた。シクロデキストリンをグロビンタンパク質の代替とした我々のミオグロビンモデルは、分子デザインの改良によってさらに機能向上を図ることができ、完全合成物による血液代替物質として非常に有望であると考えられる。

### Abstract

Although chemists succeeded in preparing synthetic hemoglobin( myoglobin )models that bind oxygen( O<sub>2</sub> )in absolute organic solvents more than 30 years ago, no successful example has been reported with binding O<sub>2</sub> in aqueous solution except for the picket fence porphyrin embedded in liposomal membrane. In this paper, we describe novel synthetic hemoglobin( myoglobin )models that work in aqueous solutions at ambient temperatures. We synthesized three types of per-O-methylated -cyclodextrin dimers having pyridine( Py3CD and Py2CD )and imidazole linkers( ImCD )as the models of the globin protein. These dimers formed very stable 1:1 inclusion complexes with a heme model, [5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphinato]iron(II) ( Fe<sup>II</sup>TPPS ) in aqueous solutions. The resulting Py3CD-Fe<sup>II</sup>TPPS( hemoCD1 ), Py2CD-Fe<sup>II</sup>TPPS( hemoCD2 ) and ImCD-Fe<sup>II</sup>TPPS ( hemoCD3 )complexes reversibly bind O<sub>2</sub> as well as carbon monoxide( CO ). The O<sub>2</sub>-affinities(  $P_{1/2}^{O_2}$  )and half-lifetimes(  $t_{1/2}$  )of the O<sub>2</sub>-adducts of hemoCD1-3 in phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C were determined: hemoCD1,  $P_{1/2}^{O_2} = 17$  Torr,  $t_{1/2} = 30$  h; hemoCD2,  $P_{1/2}^{O_2} = 176$  Torr,  $t_{1/2} > 100$  h; hemoCD3,  $P_{1/2}^{O_2} = 1.7$  Torr,  $t_{1/2} = 3$  h. HemoCD2 also binds nitric oxide( NO )in aqueous solution, while hemoCD1 decomposes upon addition of NO. The molecular mechanics( MM )calculations of hemoCD1-3 suggest that the encapsulation of the iron center of Fe<sup>II</sup>TPPS by the hydrophobic cages formed by two per-O-methylated -cyclodextrin units is quite effective for protecting the Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> center from the attack of the water molecule, leading to the formation of the

同志社大学 理工学部 機能分子・生命化学科 〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷1-3 Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science and Engineering, Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto 610-0321, Japan

論文受付 2009年8月20日 論文受理 2009年10月6日

stable O<sub>2</sub>-adduct in aqueous solution. Our hemoglobin( myoglobin )model system composed of porphinatoiron( II )and cyclodextrin dimer is expected to be a powerful candidate of the completely synthetic blood substitute.

## Keywords

Artificial oxygen carriers, Biomimetic chemistry, Cyclodextrin dimers, Hemoglobin( myoglobin )models, Porphinatoiron( II )

### 1. はじめに

生体内で起こる優れた化学反応をフラスコの中で人工的に再現することは、我々化学者にとって夢のある挑戦である。生体分子の複雑な機能のエッセンスのみを抽出し、人工的に合成した化合物によってその機能を再現できれば、生体反応の機構を分子レベルで解明できるとともに、生体のシステムを模倣した新しい機能性材料の開発につながるであろう。このような研究分野はバイオミメティックケミストリー（生体模倣化学）と呼ばれ、過去50年の長きにわたり様々な生体分子を対象としたモデル化合物が合成されてきた<sup>1)</sup>。その中でも酸素を可逆的に吸脱着するヘモグロビンならびにミオグロビンのバイオミメティックケミストリーは、この分野の主流をなす研究対象のひとつであり、研究の歴史は長い<sup>2,3)</sup>。しかし、有機溶媒中で酸素を可逆的に結合するモデル化合物は数多く報告されているものの、生体と同じ媒体である水中で酸素を捕捉することは非常に困難であり、その報告例は極めて少ない。水は酸素錯体を著しく不安定化するのである。

近年、著者らは環状オリゴ糖であるシクロデキストリンの包接現象に着目し、酸素結合サイトである Fe<sup>II</sup> ポルフィリンをマイクロな疎水環境にカプセル化して水の侵入を防ぐことのできるミオグロビンモデルを設計した<sup>5)</sup>。このモデル化合物は水中、室温で酸素を安定かつ可逆的に結合することが可能である。水中で機能するヘモグロビン（ミオグロビン）モデルの開発に成功したことにより、酸素錯体の安定性によばず水の影響について詳細に検討ができるとともに、完全合成化合物を用いた人工血液の実現へと一步踏み出すことができたものと考えている。本稿では、著者らの合成したミオグロビンモデル化合物を中心に、水中で酸素を結合するための分子設計、モデル化合物の O<sub>2</sub>、CO および NO に対する反応性や、人工血液の実現を視野に入れたさらなるアプローチについて化学的な観点から解説する。

### 2. ミオグロビンの分子構造

動物は呼吸によって外界から酸素を取り入れ、細胞内において炭水化物を代謝する際の酸化剤として利用し、生きるためにエネルギーを得ている。脊椎動物の場合、取り入れられた酸素は肺胞で赤血球へと渡され、血液によって各組織へと運搬される。赤血球内で酸素と結合するのは可逆的な酸素結合能力を有するヘモグロビンである。酸素の運搬先の各組織には、酸素貯蔵タンパク質として、ヘモグロビンの4分の1の構造ユニットから成るミオグロビンが含まれる。Fig. 1にX線結晶構造解析によって明らかにされたマッコウクジラ（sperm whale）由來のミオグロビン酸素付加体の構造およびヘム周辺の構造を示す。ミオグロビンは約17,000 Daのタンパク質であり、153個の

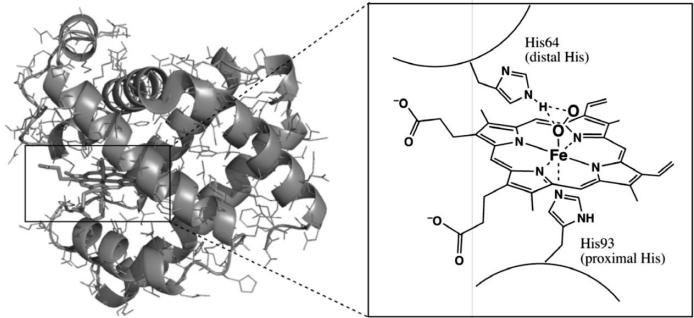


Fig. 1. Crystal structure of sperm whale oxy-myoglobin (Protein Data Bank; 1A6M) and chemical structure of the oxygen-binding site in myoglobin.

アミノ酸から構成されている。ミオグロビンのタンパク質部分であるグロビン（globin）は、全体的に球状（globular）のタンパク質であることからその名が付けられた。ミオグロビンは A鎖から H鎖までの8本の -ヘリックス鎖から構成されており、補欠分子としてヘム（プロトポルフィリンIX鉄（II）錯体）を保有している。ヘムはグロビンの表面近くの疎水ポケットに存在し、His 93（近位 His）からの配位結合、プロピオン酸側鎖と周辺のアミノ酸残基との静電相互作用、および周辺の疎水性アミノ酸残基との疎水相互作用によってグロビン内に固定されている<sup>6)</sup>。ヘムは中心に二価の鉄原子（Fe<sup>II</sup>）を有しており、その Fe<sup>II</sup> 上に1分子の酸素が配位する。ヘムはグロビンの疎水ポケットに覆われることによって外部の水から遮断されており、水中で安定な酸素錯体を形成することが可能となっている。さらにヘムの6配位目に結合した酸素分子は His 64（遠位 His）と水素結合を形成し、酸素錯体の配位構造は相当安定化されている<sup>6,7)</sup>。ミオグロビンに対する酸素の結合は可逆的であり、まわりの酸素分圧に応じて酸素の吸着と脱離を繰り返すことができる。

### 3. ミオグロビンのモデル化合物

ミオグロビンのような酸素結合機能をフラスコ内で人工的に再現することは、酸素の結合メカニズムについて様々な知見をもたらすとともに、血液代替物質、酸素富化膜、酸素センサー、酸素供給あるいは酸素除去剤などの実用化の面においても非常に興味深い研究対象である。ミオグロビン機能を人工的に模倣する試みは1950年代からすでに行われていたが<sup>8)</sup>、均一溶液中において酸素分子を可逆的に結合した最初の成功例は、1973年に Collman らが開発したピケットフェンスポルフィリンである<sup>9)</sup>。ミオグロビンの場合、酸素結合部位であるヘムはタンパク質によって立体的に保護されている。溶液中において、特に立体的

に保護されていない単純な Fe<sup>II</sup> ポルフィリンに酸素を作用させると、不可逆的に二分子間の会合による酸素架橋型（μ-オキソ）二量体が生成し、それにともなう Fe<sup>II</sup> から Fe<sup>III</sup>への酸化反応が起こって酸素結合能を失ってしまう（Fig. 2a）<sup>2,3)</sup>。Collman らは Fe<sup>II</sup> ポルフィリンに対して立体的にかさ高い置換基（ピバルアミド基）を導入することで、二分子間の会合による μ-オキソ錯体の生成を抑え、無水ベンゼン中、25 °Cにおいて安定かつ可逆的に酸素を吸着することに成功した（Fig. 2b）。その後、彼らの分子設計指針に基づいたミオグロビンモデルが数多く合成され、それらの酸素結合挙動について詳細に検討されてきた<sup>2,4)</sup>。

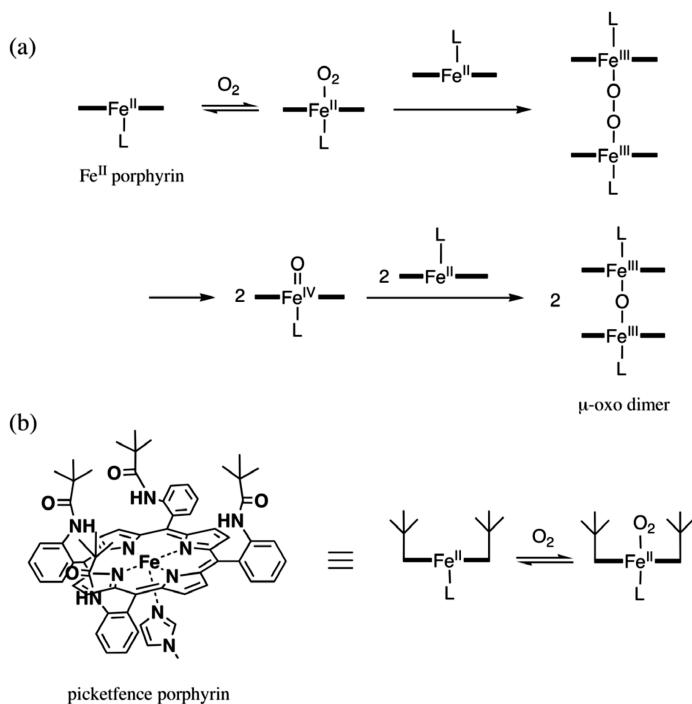


Fig. 2. Irreversible oxidation of an iron( II ) porphyrin to the μ-oxo iron( III ) porphyrin dimer induced by oxygen(a) and a picketfence porphyrin reported by Collman et al(b)

ピケットフェンスポルフィリン成功後の次なる課題は、生体系と同じ環境で機能する水溶性のモデルを合成することであった<sup>4)</sup>。しかし水が存在する系で酸素の結合に成功した報告例は極めて少ない。合成化合物の酸素錯体は水に対して非常に不安定で、ピケットフェンスポルフィリンをはじめとするほとんどの人工の酸素錯体は、溶媒にほんの少しでも水を混入させると Fe<sup>III</sup>への自動酸化反応が起り、酸素結合能を失ってしまう。そのため、モデル化の研究は厳密な脱水条件下でのみ行われてきた。ミオグロビンのように水中で安定な酸素錯体を形成するためには、立体障害によって二量化による μ-オキソ錯体の形成を抑えるだけでは不十分であり、タンパク質内のポケットのように周囲の水から隔離されたミクロな疎水環境をつくる必要がある<sup>10)</sup>。

水系におけるいくつかのモデル化のアプローチを挙げる。

Aida らは、Fe<sup>II</sup> ポルフィリンの周辺に疎水的なデンドリマー側鎖を導入して Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> 結合部分への水の接近を防ぎ、水を混ぜたトルエン中でも安定な酸素錯体を形成することに成功した<sup>11)</sup>。しかし、この分子は水に不溶であるため、100 % 水中の知見は得られていない。一方、Collman および Diederich らが合成した水溶性の Fe<sup>II</sup> ポルフィリンデンドリマーは、Aida らの系と同様に水を混ぜたトルエン中では酸素錯体を生成するものの、100 % 水中では瞬時に自動酸化反応が起こると報告されている<sup>12)</sup>。Tsuchida らはカチオン性ポルフィリン-シクロデキストリン-フェニルイミダゾールを組み合わせた水溶性の超分子錯体を報告しており、DMF / 水 = 3 / 2 の溶媒中で酸素錯体が生成すると報告している<sup>13)</sup>。Groves らはトリエチレングリコールおよびピリジンで修飾したシクロデキストリン誘導体と Fe<sup>II</sup> ポルフィリンとの包接錯体を用いて水中で酸素錯体の生成を確認したと報告しているが<sup>14)</sup>、酸素錯体生成の証拠が不十分であり、その後も詳細な報告がなされていない。100 % の水中で酸素錯体を形成したという確かな成功例は、Tsuchida らの脂質膜を利用した系である<sup>15-18)</sup>。彼らは水中において、疎水的な脂質分子膜中に Fe<sup>II</sup> ポルフィリンを埋め込むことによって、安定な酸素錯体が形成可能となることを報告している。

これらの水を含んだ系での検討から、水が Fe<sup>II</sup> ポルフィリン酸素錯体の自動酸化反応を誘発することは明らかである。水中でミオグロビンと同じように Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> 結合部位周辺を隔離し、安定な酸素錯体を構築することは極めて困難である。これまでに脂質膜の系を除いて完全な水中で酸素錯体を形成した合成化合物の報告例はない。このため、水中における酸素錯体の詳細な研究は遅れており、合成化合物による血液代替物の開発も遅れている。水中で機能するミオグロビンモデルを実現するためには、水中で Fe<sup>II</sup> ポルフィリンを疎水環境に隔離することが必要不可欠である。

#### 4. シクロデキストリンを用いた生体モデル系の構築

シクロデキストリン（CD）はグルコピラノース環が -1,4 グルコシド結合によって連なった環状オリゴ糖であり、構成単位であるグルコピラノースが 6, 7 および 8 個のものをそれぞれ - , - および - CD と呼ぶ（Fig. 3）。CD は円錐台形のへりに多数の水酸基を有するために水溶性であり、その空洞内は C-H 結合に覆われているために疎水性を示す。この疎水空洞の大き

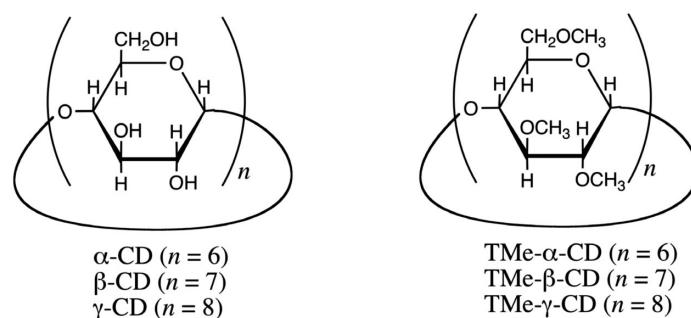


Fig. 3. Cyclodextrins and their per-O-methylated derivatives.

さに適合した疎水性化合物あるいは疎水性置換基があると、それらの疎水部分は水溶液中でCDに包接される<sup>19)</sup>。1960年代、BenderらはCDが水中でエステルの加水分解反応を位置異性体選択的に触媒することを見出した<sup>20)</sup>。これはあたかもCDが酵素のように分子を識別しているものと考えられ、CDを用いたバイオミメティックケミストリー研究のさきがけとなった。これをきっかけに水中でのバイオミメティックケミストリーは飛躍的に発展し、CDはタンパク質モデルとして広く利用されるようになった<sup>21) 22)</sup>。

我々は過去に-CDの全ての水酸基をO-メチル化したTMe- -CD (Fig. 3)が、水中でアニオン性のテトラアリールポルフィリン類を異常なほど強く包接することを見出している (Fig. 4)<sup>23-25)</sup>。これらの錯体に対する結合定数は測定できない程に大きく、水中で極めて安定な1:2包接錯体が生成する。さらに2分子のTMe- -CDがポルフィリン金属錯体を包接すると、その金属イオン周辺には水分子の接近が妨げられたミクロな疎水環境が形成されることを明らかにした<sup>26) 27)</sup>。このような機能は、まさにミオグロビンのグロビンタンパク質が果たす機能の1つと同じである。我々は、TMe- -CD-水溶性ポルフィリン包接錯体が水中で機能するミオグロビンモデルの素材として非常に有望であると考えた。

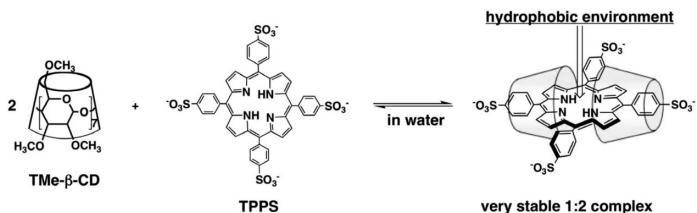
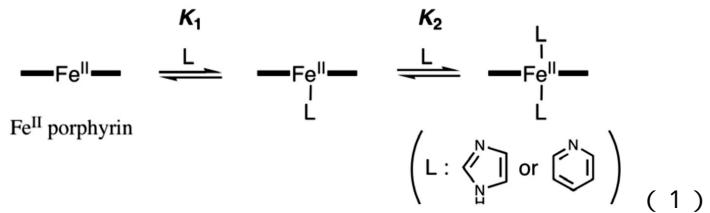


Fig. 4. Formation of a stable 1:2 complex of a 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin (TPPS) and TMe- -CDs in aqueous solution.

## 5. 水中で酸素を結合させるための分子設計

ミオグロビンやそのモデル系で実証されているように、酸素結合部位となるFe<sup>2+</sup>イオンには、ポルフィリン平面の4つの窒素原子からの配位結合に加えて、5番目の配位子としてひとつの芳香族ヘテロ環化合物が結合した状態となって、はじめて第6配位座に酸素を結合することができる。すなわち、安定な酸素付加体の形成には、酸素結合サイトの反対側（トランス位）の配位子からの電子供与によるFe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>結合の安定化が不可欠である<sup>3) 6) 28)</sup>。TMe- -CDをミオグロビンのタンパク質モデルとして用いるためには、1つの配位子をポルフィリンのFe<sup>II</sup>中心に配位させて5配位状態を作らなければならない。ここで難しいのが、単にイミダゾールやピリジンなどの配位子をFe<sup>II</sup>ポルフィリンに共存させるだけでは、5配位状態よりもはるかに熱力学的に安定な6配位状態を容易に形成してしまうことである ( $K_2 > K_1$ ) (式1)<sup>3) 28)</sup>。



2つのLがジアキシャル配位してしまうと、肝心の酸素結合サイトを失ってしまう。そこで我々は2つのTMe- -CDによってFe<sup>II</sup>ポルフィリンを疎水場にカプセル化しつつ、Fe<sup>II</sup>中心が5配位状態となるように、ピリジン配位子を分子内に組み込んだTMe- -CDの二量体 (Py3CD) を設計した (Fig. 5)。

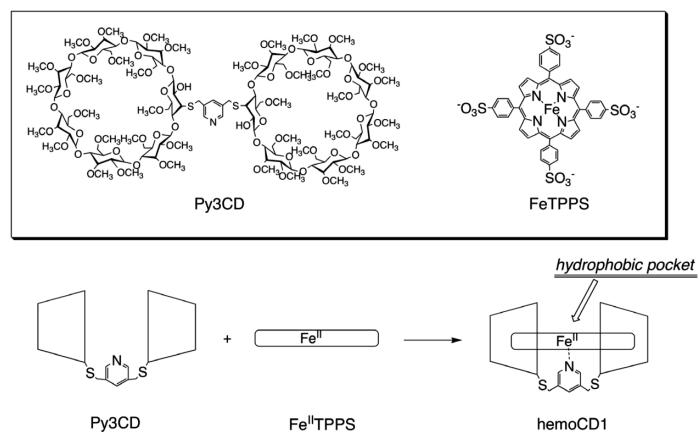


Fig. 5. Structures of an O-methylated -cyclodextrin dimer having a pyridine linker (Py3CD) [5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphinato]iron (FeTPPS) and Py3CD-Fe<sup>II</sup>-TPPS complex (hemoCD1) as a myoglobin model that works in aqueous solution.

## 6. 水中・室温で酸素を結合するミオグロビンモデル“hemoCD”

我々が設計したPy3CDは、市販の-CDを出発物質に計4段階のステップを経て合成可能であった (Fig. 6)<sup>3)</sup>。得られたPy3CDの包接能を調べるために、Fe<sup>III</sup>-TPPS (Fig. 5)との相互作用をUV-vis, NMRスペクトルおよび質量分析により確認した。その結果、Py3CDはFe<sup>III</sup>-TPPSとFig. 5下段に示したよう

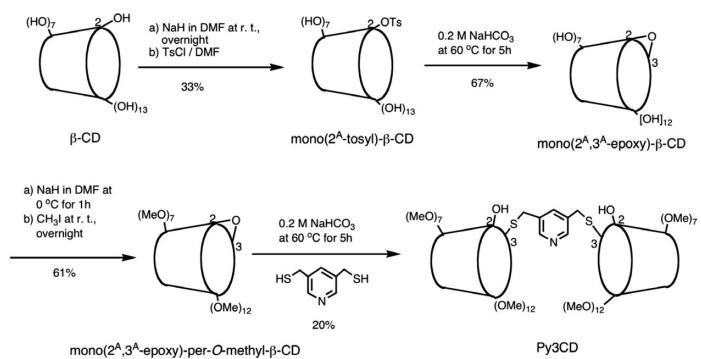


Fig. 6. Synthesis of Py3CD.

な非常に安定な1:1の包接錯体を形成することが分かった。<sup>29)</sup>もともとTMe<sub>2</sub>-CDはFe<sup>III</sup>TPPSへの包接力が大きい上に、第5配位子としてピリジンリンカーが中心の鉄へ結合するために、結果としてPy3CDとFe<sup>III</sup>TPPSとの相互作用は結合定数が測定不可能なくらいに強くなっている。

Fe<sup>II</sup>TPPS-Py3CD包接錯体(met-hemoCD1)の水溶液に還元剤としてハイドロサルファイトナトリウム(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)を加えると、met-hemoCD1の1電子還元体であるFe<sup>II</sup>TPPS-Py3CD包接錯体(hemoCD1)が得られる(Fig. 7)。このとき、過剰に加えたNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>は溶液中の酸素とも反応し、溶液に含まれる酸素が失われて無酸素状態となる。そこでNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>添加後の溶液をゲルろ過カラム(Sephadex G-25)によって精製することにより、過剰のNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>を除く操作を行った。カラム処理中にhemoCD1の溶液は鈍い赤色から徐々に鮮血色へと変化するため、hemoCD1が空気中の酸素と結合してoxy-hemoCD1と変化していく様子が視覚的に分かる。カラム精製後の溶液のUV-visスペクトルを測定すると、極大吸収波長が422 nmに観測された(Fig. 8)。その溶液中の酸素分圧を下げる目的で窒素ガスを10分間程度通気すると、スペクトルの極大吸収波長は脱酸素(デオキシ)状態を示す434 nmへと変化した。そこへ空気を吹き込むと再びスペクトルは元の422 nmへと戻る。この変化は可逆的で何度も繰り返すことが可能であった(Fig. 8)。したがってhemoCD1は水中の酸素分圧に応じた可逆的な酸素の吸脱着能を保有することが明らかとなった。酸素錯体の証拠を

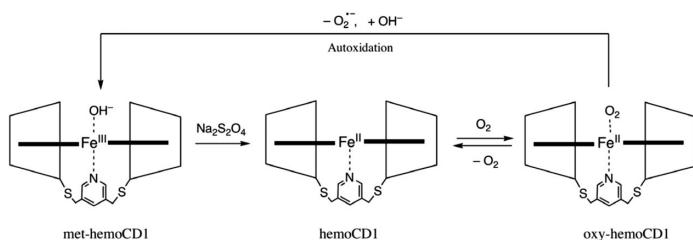


Fig. 7. Reduction of met-hemoCD1 by Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, oxygenation of hemoCD1, and autoxidation of oxy-hemoCD1.

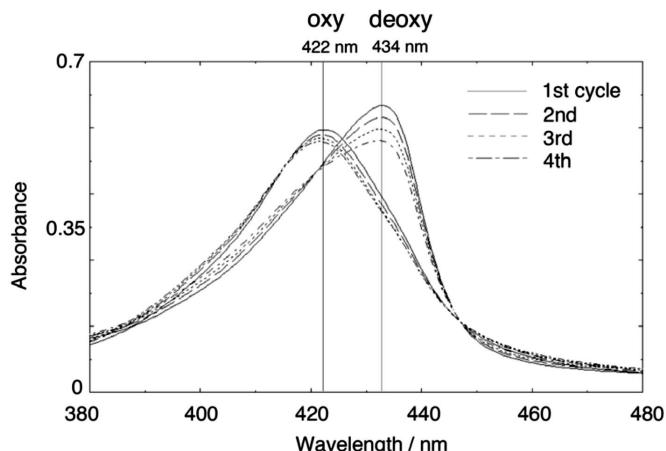


Fig. 8. Reversible oxygen binding of hemoCD1 by successive O<sub>2</sub> / N<sub>2</sub> bubbling cycles in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C.

得るために、oxy-hemoCD1の共鳴ラマンスペクトルを測定した結果、Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>結合を証明するバンドが569 cm<sup>-1</sup>に観測され、天然のミオグロビンの値(571 cm<sup>-1</sup>)<sup>30)</sup>と非常に近い値となり、構造的にもミオグロビンと類似していることが分かった。

oxy-hemoCD1は天然のオキシミオグロビンと同じ様に、水溶液中で放置すると徐々にmet-hemoCD1へと変化する自動酸化(メト化)反応が観測された(Fig. 9a)。その反応速度は $k = 0.023 \text{ h}^{-1}$ であり、半減期( $t_{1/2}$ )にすると約30時間となつた。ほぼ同条件の測定で報告されているミオグロビンの自動酸化(sperm whale, 半減期約140時間)<sup>31)</sup>と比べるとかなり速いが、用途によっては十分に実用可能なレベルの安定性である。このoxy-hemoCD1の自動酸化反応速度は周囲の環境に大きく影響される<sup>32)</sup>。Fig. 9bにoxy-hemoCD1の自動酸化反応速度のpH依存性を示す。ミオグロビンやヘモグロビンと同様<sup>31)</sup>にoxy-hemoCD1の自動酸化は中性のpH領域で最も遅く、pH 4以下およびpH 10以上において、著しい酸素錯体の不安定化が観測された。酸性条件下ではPy3CDのピリジンの窒素原子にプロトン化が起こって配位結合が外れ、酸素錯体を維持できなくなる。一方アルカリ性条件下では、水酸化物イオンによるFe<sup>II</sup>への求核攻撃が起り、スーパーオキシドアニオンが脱離しやすくなると考えられる(式2)。

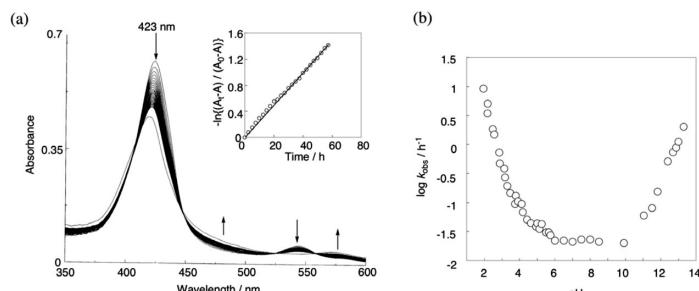
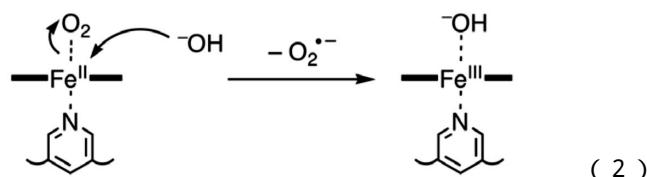


Fig. 9. (a) Progressive spectral change during autoxidation reaction of oxy-hemoCD1 ( $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) under air in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25 °C. Scans were carried out at 2.5 hour intervals. Inset: first-order plot based on the absorption change at 423 nm. (b) Plot of  $\log(k_{\text{obs}}/\text{h})$  versus pH for autoxidation of oxy-hemoCD1 at 25 °C.



この求核置換(S<sub>N</sub>2)反応に類似した自動酸化反応メカニズムを支持する結果として、中性の水溶液中で求核性の高いN<sub>3</sub><sup>-</sup>イオンやOCN<sup>-</sup>イオンを添加したときにも、アルカリ性の溶液中と同じく自動酸化の著しい加速が見られた<sup>32)</sup>。天然のミオグロビンの自動酸化反応はタンパク質の構造変化など複雑な要因があるためにその機構を一義的に解釈できず、数々のメカニズム

が提案されている<sup>6,31)</sup>。一方、oxy-hemoCD1の自動酸化の場合は非常にシンプルであり、S<sub>N</sub>2反応に類似した機構で説明することができる。これは、Shikamaらが一貫して主張してきたミオグロビンの自動酸化反応メカニズム<sup>31)</sup>とよく一致している。

hemoCD1水溶液のUV-visスペクトルを酸素分圧を変化させて測定すると、分圧の変化に伴ってスペクトルはデオキシ体からオキシ体へと段階的な変化を示した(Fig. 10a, b)。このスペクトル変化から得られた酸素飽和曲線は、ミオグロビンと同様に単純な飽和型となり、酸素親和性を示す $P_{1/2}^{O_2}$ の値は17 Torrとなった。この値から、hemoCD1の酸素親和性はミオグロビンよりも低く、ほぼ同条件で報告されているヘモグロビンのT状態の親和性(26 Torr)に比較的近いことが分かった(Table 1)。すなわちhemoCD1は、ヘモグロビンのような酸素運搬体としての性能を秘めていることが示唆された。

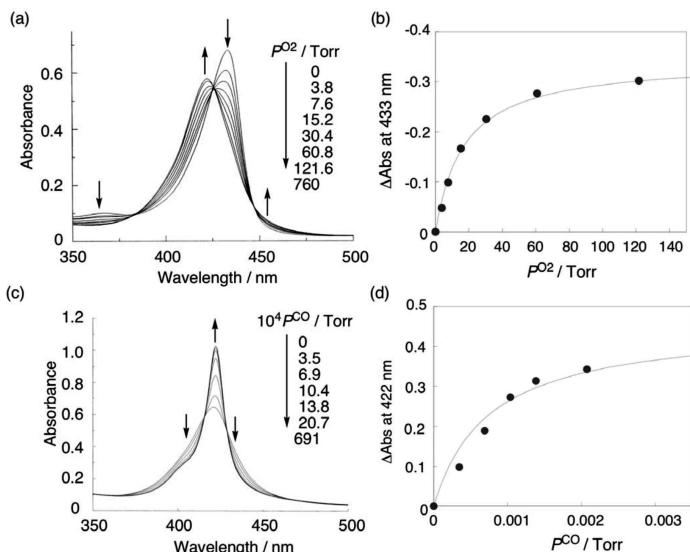


Fig. 10. UV-vis spectral change of hemoCD1 ( $5 \times 10^{-6}$  M) as a function of the  $O_2$  partial pressure ( $P^{O_2}$ ) in  $N_2$  (a) the titration curve for  $O_2$  binding to hemoCD1 (b) UV-vis spectral change of oxy-hemoCD1 ( $5 \times 10^{-6}$  M) as a function of the CO partial pressure( $P^{CO}$ ) in  $N_2$  (c) and the titration curve for CO binding to oxy-hemoCD1 (d) All spectra were measured in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and 25°. The solid lines in (b)and (d) are the theoretical curves for determining  $P_{1/2}^L$  ( $L = O_2$  and CO).

## 7. COおよびNOに対する反応性

hemoCD1はヘモグロビンやミオグロビンと同様に一酸化炭素(CO)と非常に強く結合する<sup>32)</sup>。Fig. 10cおよびdに、CO分圧を徐々に上げていったときのoxy-hemoCD1の水溶液のUV-visスペクトル変化およびその飽和曲線を示す。このUV-visスペクトル変化から、hemoCD1のCOに対する親和性を算出すると $P_{1/2}^{CO} = 1.5 \times 10^{-5}$  Torrとなり、ミオグロビン(0.029 Torr)と比べると圧倒的にCO親和性が高いことが分かった(Table 1)。ヘモグロビンやミオグロビンでは遠位Hisによる立体的および電子的な効果によって、有毒なCOのヘムへの結合をある程度抑制することができる<sup>4,33,34)</sup>。しかしhemoCD1にはそのような抑制部位がないために、結果としてCOに対する親和性が高くなつたものと考えられる。ミオグロビンの遠位Hisのように、hemoCD1のCO親和性を抑制するような部位を導入することができればより天然に近いモデルとなり、人工酸素運搬体としての性能の向上につながるであろう。現在、hemoCD1への遠位Hisの導入をめざした分子設計を進めている段階である。

ミオグロビンに対して $O_2$ やCOよりもさらに強く結合する二原子分子は、一酸化窒素(NO)である<sup>6)</sup>。体内に存在するNOには血管拡張作用があるため、hemoCD1が体内でNOを結合してその働きを奪ってしまうと、高血圧症を誘発する恐れがある。しかしながら、hemoCD1の水溶液にNOガスを加えると、hemoCD1はNOと結合せずに徐々に分解するのみであった。hemoCD1は分子内にスルフィド結合を有しているため、NOによる硫黄原子のS-ニトロソ化反応が起こり、それとともに分解反応が起こるものと考えられる。そこでhemoCD1の類縁体として、硫黄原子を持たないPy2CD(Fig. 11)とFe<sup>II</sup>TPPSとの包接錯体(hemoCD2)を用いて、NOとの反応性を検討した<sup>35)</sup>。Fe<sup>III</sup>の状態であるmet-hemoCD2の水溶液にNOガスを吹き込むと、UV-visスペクトルは瞬時に変化し、420 nmに極大吸収波長を持つ化合物へと変化した。この吸収極大はFe<sup>II</sup>ポルフィリンにNOとピリジン環の窒素原子がそれ

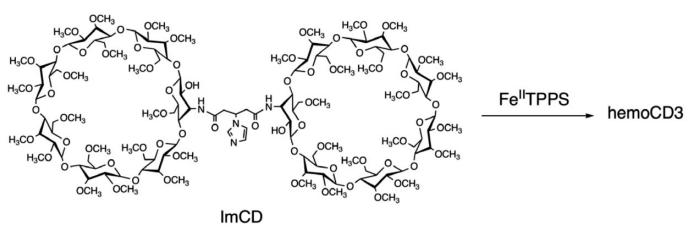
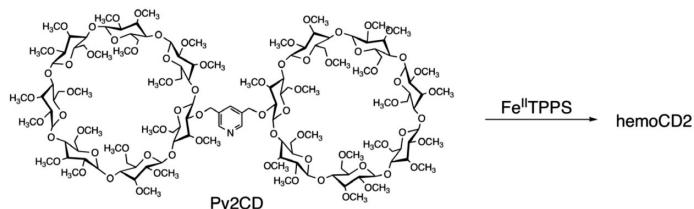


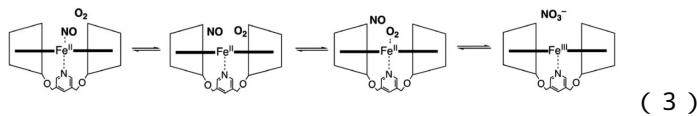
Table 1.  $O_2$  and CO affinities and half-lifetimes in biological and model systems in aqueous solutions at pH 7 and 25

system	$P_{1/2}^{O_2}$ (Torr)	$P_{1/2}^{CO}$ (Torr)	$t_{1/2}$ (h)	ref
myoglobin(sperm whale)	0.54	0.029	140	6, 31
hemoglobin(human R)	0.22	$1.3 \times 10^{-3}$	>60	4
hemoglobin(human T)	26			3
hemoCD1	17	$1.5 \times 10^{-5}$	30	5, 32
hemoCD2	176	$1.6 \times 10^{-2}$	>100	35
hemoCD3	1.7	$1.6 \times 10^{-3}$	3	39

Fig. 11. Structures of Py2CD and ImCD

それアキシャル配位した6配位錯体の文献値<sup>36)</sup>とよく一致する。したがって、Fe<sup>III</sup>の還元的ニトロソ化<sup>37)</sup>によってミオグロビンと同じFe<sup>II</sup>-NO錯体(NO-hemoCD2)が生成したものと考えられる。NO-hemoCD2の配位構造は、77 KにおけるEPRスペクトル測定によっても6配位構造であることが確かめられた。

NO-hemoCD2は水中、室温および空気下において徐々にmet-hemoCD2とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>へと変化した(半減期6.3 h)。この反応速度は溶液中の酸素分圧に依存して変化することから、NO錯体の酸化反応には酸素分子が関与した式3のようなメカニズムで進行しているものと考えられる。



すなわち、Fe<sup>II</sup>-NO錯体が溶液中の酸素と交換反応を起こしていったんFe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>錯体が生成した後、解離したNOはFe<sup>II</sup>に配位した酸素によって酸化され、Fe<sup>III</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>となって溶液中に拡散すると考えられる。NOからNO<sub>3</sub><sup>-</sup>への酸化反応はオキシミオグロビンやオキシヘモグロビンによっても同様に起こることが知られている<sup>38)</sup>。この研究によって、モデル化合物を用いて初めてそのメカニズムを水中で検証することに成功した。

## 8. 分子設計による機能改変

酸素運搬体として合成化合物を用いるひとつのメリットは、分子構造を可能な範囲で自由にデザインし、より高機能化をはかることができる点である。我々は上述のhemoCD1およびhemoCD2に加えて、より天然のミオグロビンの構造に近づける目的で、第5配位子をミオグロビンと同じイミダゾールにしたImCDを合成した(Fig. 11)<sup>39)</sup>。ImCDもPy2CDおよびPy3CDと同様に水中においてFe<sup>II</sup>TPPSと非常に安定な包接錯体(hemoCD3)を形成し、hemoCD3のFe<sup>II</sup>中心には酸素が結合可能であった。hemoCD1、hemoCD2およびhemoCD3それぞれの酸素親和性および酸素錯体の半減期をTable 1に示す。第5配位子をイミダゾールに変えると、酸素親和性は著しく向上し、ミオグロビンと比較的近い値を示した。これは、hemoCD1およびhemoCD2の第5配位子であるピリジンよりも、ミオグロビンやhemoCD3の持つイミダゾールの方がFe<sup>II</sup>への電子供与能が強く、より強いFe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>結合を形成することによる結果である。酸素錯体の半減期をそれぞれ比較すると、hemoCD1は30時間、hemoCD2は測定範囲内(~100 h)ではほとんど自動酸化を起こさなかったのに対し、hemoCD3の場合では3時間とかなり速くメト化した。これについては、分子計算により求めた最適化構造を比較すると、その原因を推察することができる。MM2計算により求めたhemoCD1、hemoCD2およびhemoCD3の分子の最適化構造をFig. 12に示す。hemoCD1およびhemoCD2では、スペースフーリングモデルで表示すると、中心のFe<sup>II</sup>はCDによって完全に覆い隠され

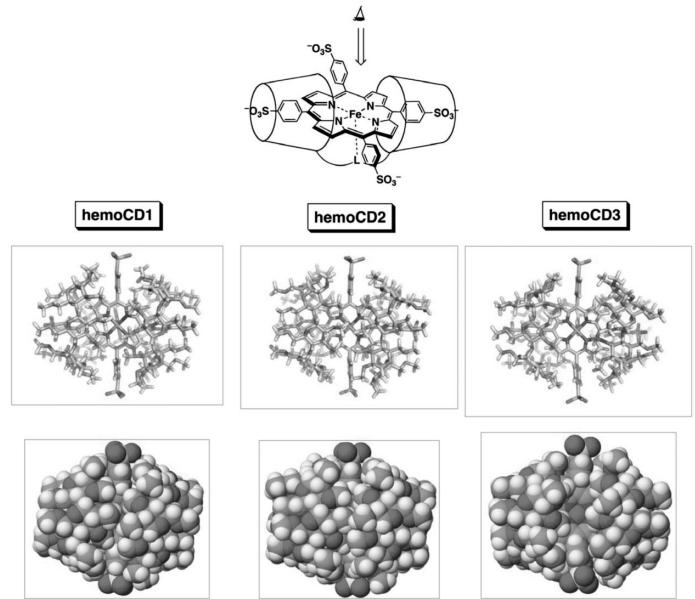


Fig. 12. Energy-minimized structures of hemoCD1, hemoCD2, and hemoCD3 obtained from the MM2 calculations using a BioMedCAche 6.0 software.

ているのに対し、hemoCD3ではFe<sup>II</sup>中心がCDによって覆われきれずに露呈していることが分かる。すなわちこの計算結果は、hemoCD3ではFe<sup>II</sup>中心へのバルク水の侵入を防ぎきれていないことを示しており、これが酸素錯体の不安定性につながっていると考えられる。このような違いは、2つのCDを繋ぐリンカーの構造に起因している。hemoCD1やhemoCD2では、リンカーがフレキシブルな構造でCDがFe<sup>II</sup>TPPSを十分にカプセル化できるように構造変化が起こるのに対し、hemoCD3ではリンカー部分の構造に剛直なアミド結合を含むため、それが原因となり2つのCDユニットがFe<sup>II</sup>TPPSを深くカプセル化することができない。このような微妙な分子構造の違いが酸素錯体の安定性に大きく影響する。これら3つの分子の比較から、水中で酸素を安定に結合するためには、できる限りFe<sup>II</sup>中心をバルク水から保護してやることが大切であることが分かった。

## 9. 今後の展望 - 人工血液へのアプローチ -

以上の検討から、タンパク質を用いずとも完全合成系で水中・室温で酸素を可逆的に結合できることが明らかとなった。合成化合物を血液代替物として用いることにより、(1)自由に分子設計することにより酸素結合機能を目的に合うように調整でき、(2)生物由来のものを用いないため感染症の心配がなく、(3)大量に生産することができるなどのメリットがある。我々のモデル化合物を人工血液へと近づけるにあたって解決しなければならない問題点は、その分子サイズである。ヘモグロビンは血液中で数百μmの大きさの赤血球に包まれており、血管外へと漏れだすことはない。一方、hemoCDの分子サイズは約2 nmと非常に小さく、血管外へと漏れてしまう可能性が高い。実際に動物を用いた実験では、oxy-hemoCD1の

PBS溶液をラットの静脈内へ注入すると、毒性などは全く示さなかったが、注入したhemoCD1はすみやかに糸球体ろ過されて30分以内に尿中に排泄されてしまうことが分かった。尿を分析した結果、尿中のhemoCD1はその包接錯体の構造を保ったままであった。さらに興味深いことに、尿中のhemoCD1は内因性のCOと結合したCO錯体の形となっていた。すなわちhemoCD1はその非常に高いCO親和性と小さな分子サイズの効果により、体内でCOを捕まえて体外へと排出させるCO除去試薬としての効果があることが明らかとなった<sup>40)</sup>。このように、生体分子をモデル化するにあたって、当初予想しなかった新たな事実を発見することができるのかは、バイオミメティックケミストリーの醍醐味の1つであろう。

現在、我々はhemoCDを人工血液として利用するために、hemoCDの高分子化やナノ粒子化を試みている。分子サイズの増大によりhemoCDの血中滞在時間が長くなれば、生体内で酸素運搬体として働く可能性は非常に高い。これまでにバイオミメティックケミストリーにおける研究成果が実用化された例はほとんどない。我々の研究がこの状況を打破できることを願っている。

## 参考文献

- Murakami Y, Kikuchi J, Hisaeda Y, Hayashida O. Artificial enzymes. *Chem Rev* 1996; 96: 721-758.
- Collman JP. Synthetic models for the oxygen-binding hemoproteins. *Acc Chem Res* 1977; 10: 265-272.
- Momenteau M, Reed CA. Synthetic heme-dioxygen complexes. *Chem Rev* 1994; 94: 659-698.
- Collman JP, Boulatov R, Sunderland CJ, Fu L. Functional analogues of cytochrome c oxidase, myoglobin, and hemoglobin. *Chem Rev* 2004; 104: 561-588.
- Kano K, Kitagishi H, Kodera M, Hirota S. Dioxygen binding to a simple myoglobin model in aqueous solution. *Angew Chem Int Ed* 2005; 44: 435-438.
- Springer BA, Sliger SG, Olson JS, Phillips GN Jr. Mechanisms of ligand recognition in myoglobin. *Chem Rev* 1994; 94: 699-714.
- Phillips SEV, Schoenborn BP. Neutron diffraction reveals oxygen-histidine hydrogen bond in oxymyoglobin. *Nature* 1981; 292: 81-82.
- Wang JH. Hemoglobin studies. II. A synthetic material with hemoglobin-like property. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 3168-3169.
- Collman JP, Gagne RR, Halbert TR, Marchon JC, Reed CA. Reversible oxygen adduct formation in ferrous complexes derived from a picket fence porphyrin. Model for oxymyoglobin. *J Am Chem Soc* 1973; 95: 7868-7870.
- Shikama K. Stability properties of dioxygen-iron(II) porphyrins: an overview from simple complexes to myoglobin. *Coord Chem Rev* 1988; 83: 73-91.
- Jiang DL, Aida T. A dendritic iron porphyrin as a novel hemoprotein mimic: effects of the dendrimer cage on dioxygen-binding activity. *Chem Commun* 1996; 1523-1524.
- Zingg A, Felber B, Gramlich V, Fu L, Collman JP, Diederich F. Dendritic iron(II)porphyrins as models for hemoglobin and myoglobin: specific stabilization of O<sub>2</sub> complexes in dendrimers with H-bond-donor centers. *Helv Chem Acta* 2002; 85: 333-351.
- Komatsu T, Hayakawa S, Tsuchida E, Nishide H. *meso-Tetrakis[*o*(N-methyl)pyridinium]porphyrin ensembles with axially coordinated cyclodextrin-penetrating phenylimidazole: reversible dioxygen-binding in aqueous DMF solution*. *Chem Commun* 2003; 50-51.
- Zhou H, Groves JT. Hemodextrin: a self-assembled cyclodextrin-porphyrin construct that binds dioxygen. *Biophys Chem* 2003; 105: 639-648.
- Tsuchida E, Nishide H, Yuasa M, Hasegawa E, Matsushita Y. Liposomal heme as oxygen carrier under semi-physiological conditions. *J Chem Soc Dalton Trans* 1984; 1147-1151.
- Tsuchida E, Komatsu T, Arai K, Nishide H. Synthesis and dioxygen-binding properties of double-sided porphyrinatoiron(II)complexes bearing covalently bound axial imidazole. *J Chem Soc Dalton Trans* 1993; 2465-2469.
- Komatsu T, Moritake M, Nakagawa A, Tsuchida E. Self-organized lipid-porphyrin bilayer membranes in vesicular form: nanostructure, photophysical properties, and dioxygen coordination. *Chem Eur J* 2002; 8: 5459-5480.
- Tsuchida E, Sou K, Nakagawa A, Sakai H, Komatsu T, Kobayashi K. Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes, based on bioconjugate chemistry. *Bioconjugate Chem* 2009; 20: 1419-1440.
- Bender ML, Komiyama M. *Cyclodextrin Chemistry* Springer-Verlag: New York, 1978.
- VanEtten RL, Sebastian JF, Clowes GA, Bender ML. Acceleration of phenyl ester cleavage by cycloamyloses. A model for enzymic specificity. *J Am Chem Soc* 1967; 89: 3242-3253.
- Breslow R, Dong SD. Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives. *Chem Rev* 1998; 98: 1997-2011.
- ナノマテリアルシクロデキストリン・シクロデキストリン学会編.千葉:米田出版.2005.
- Kano K, Tanaka N, Minamizono H, Kawakita Y. Tetraarylporphyrins as probes for studying mechanism of inclusion-complex formation of cyclodextrins. Effect of microscopic environment on inclusion of ionic guests. *Chem Lett* 1996; 925-926.
- Kano K, Nishiyabu R, Asada T, Kuroda Y. Static and

- dynamic behavior of 2:1 inclusion complexes of cyclodextrins and charged porphyrins in aqueous organic media. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 9937-9944.
25. Kano K, Nishiyabu R, Doi R. Novel behavior of O-methylated -cyclodextrins in inclusion of meso-tetraarylporphyrins. *J Org Chem* 2005; 70: 3667-3673.
  26. Kano K, Kitagishi H, Tamura S, Yamada A. Anion binding to a ferric porphyrin complexed with per-O-methylated -cyclodextrin in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 2004; 126: 15202-15210.
  27. Kano K, Kitagishi H, Sone Y, Nakazawa N, Kodera M. Redox behavior of a manganese porphyrin complexed with per-O-methylated -cyclodextrin in aqueous solution. *Eur J Inorg Chem* 2006; 2006: 4043-4053.
  28. 鈴木正樹 .生物無機化学 .増田秀樹 ,福住俊一 編 .東京 :三共出版 .2005; 145-174.
  29. Kano K, Kitagishi H, Tanaka S. Characterization of an inclusion complex of 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphinato iron and an O-methylated -cyclodextrin dimer having a pyridine linker and its related complexes in aqueous solution. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2006; 56: 69-74.
  30. Hirota S, Ogura T, Appelman EH, Shinzawa-ito K, Yoshizawa S, Kitagawa T. Observation of a new oxygen-isotope-sensitive Raman band for oxyhemoproteins and its implications in heme pocket structure. *J Am Chem Soc* 1994; 116: 10564-10570.
  31. Shikama K. The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: a venerable puzzle. *Chem Rev* 1998; 98: 1357-1373.
  32. Kano K, Kitagishi H, Dagallier C, Kodera M, Matsuo T, Hayashi T, Hisaeda Y, Hirota S. Iron porphyrin-cyclodextrin supramolecular complex as a functional model of myoglobin in aqueous solution. *Inorg Chem* 2006; 45: 4448-4460.
  33. Collman JP, Fu L. Synthetic models for hemoglobin and myoglobin. *Acc Chem Res* 1999; 32: 455-463.
  34. Tani F, Matsu-ura M, Ariyama K, Setoyama T, Shimada T, Kobayashi S, Hayashi T, Matsuo T, Hisaeda Y, Naruta Y. Iron twin-coronet porphyrins as models of myoglobin and hemoglobin: amphibious electrostatic effects of overhanging hydroxyl groups for successful CO/O<sub>2</sub> discrimination. *Chem Eur J* 2003; 9: 862-870.
  35. Kano K, Itoh Y, Kitagishi H, Hayashi T, Hirota S. A supramolecular receptor of diatomic molecules(O<sub>2</sub>, CO, NO) in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 8006-8015.
  36. Praneeth VKK, Nather C, Peters G, Lehnert N. Spectroscopic properties and electronic structure of five- and six-coordinate iron(II)porphyrin NO complexes: effect of the axial N-donor ligand. *Inorg Chem* 2006; 45: 2705-2811.
  37. Fernandez BO, Lorkovic IM, Ford PC. Mechanism of ferriheme reduction by nitric oxide: nitrite and general base catalysis. *Inorg Chem* 2004; 43: 5393-5402.
  38. Herold S, Exner M, Nauser T. Kinetic and mechanistic studies of the NO-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. *Biochemistry* 2001; 40: 3385-3395.
  39. Kano K, Kitagishi H, Mabuchi T, Kodera M, Hirota S. A myoglobin functional model composed of a ferrous porphyrin and a cyclodextrin dimer with an imidazole linker. *Chem Asian J* 2006; 1: 358-366.
  40. 加納航治 ,北岸宏亮 ,根木滋 ,喜里山暁子 ,本保亜希乃 ,川口章 ,塚田秀夫 .一酸化炭素除去剤 .特許出願中 (特願2009-43632 )

# ヘモグロビン小胞体 (HbV) の体内動態特性

## The Pharmacokinetic Properties of Hemoglobin-vesicles

田口和明<sup>(1)</sup>, 丸山徹<sup>(1,2)</sup>, 小田切優樹<sup>(1,3)</sup>

Kazuaki Taguchi<sup>(1)</sup>, Toru Maruyama<sup>(1,2)</sup>, Masaki Otagiri<sup>(1,3)</sup>

### 和文抄録

ヘモグロビン (Hb) 小胞体 (hemoglobin vesicle ; HbV) は直径約 250 nm の均一な粒径のリン脂質二分子膜より構成される小胞体中に、ヒト赤血球由来 Hb を高濃度で内包させたポリエチレングリコール (PEG) 修飾細胞型人工酸素運搬体である。これまでに、製剤化試験・薬理試験など数多くの前臨床試験において HbV の有用性が証明されているが、HbV の体内動態に関する情報は不足している。そこで我々は、HbV の体内動態特性について検討を行った。Hb 及び HbV の内部 Hb をヨウ素 (<sup>125</sup>I) 標識した <sup>125</sup>I-Hb 及び <sup>125</sup>I-HbV を用いた体内動態実験より、Hb を小胞体化することで腎臓及び肝臓への分布が抑制され、血中半減期は 30 倍に延長した。また、投与量依存的に <sup>125</sup>I-HbV の肝臓及び脾臓における取り込みクリアランス (CL<sub>uptake</sub>) は減少し、消失半減期は 1400 mg Hb/kg の投与量において約 19 時間まで増大した。<sup>125</sup>I-HbV 及び HbV の膜構成コレステロールをトリチウム (<sup>3</sup>H) で標識した HbV (<sup>3</sup>H-HbV) を用い、HbV 構成成分の体内動態について検討したところ、<sup>125</sup>I-HbV 及び <sup>3</sup>H-HbV の血漿中濃度推移はほぼ一致したことから HbV は小胞体構造を保持したまま血中を滞留することを確認した。また両標識体ともに主要分布臓器は肝臓及び脾臓であることが示された。加えて、初代肝実質及び肝内皮細胞、さらにはクッパー細胞の代替として RAW 264.7 細胞を用い、HbV の取り込みに関与する細胞種の探索を行ったところ、RAW 264.7 細胞においてのみ、<sup>125</sup>I-HbV の特異的な取り込み及び分解が認められ、HbV の取り込み・分解には細網内皮系細胞 (MPS) が関与することが明らかとなった。さらに興味深いことに、肝臓及び脾臓で分解された後、HbV の内部 Hb と脂質成分は異なる動態特性を示すことが判明した。すなわち、Hb は速やかに臓器中から消失後、7 日以内に尿中へ排泄されるものの、脂質成分は 14 日以内に胆汁中より糞中へ排泄された。また、マウスにリポソーム製剤を投与することで惹起される Accelerated Blood Clearance (ABC) 現象の有無を HbV について検討するために、非標識 HbV 投与 (0.1 or 1400 mg Hb/kg) 7 日後に <sup>125</sup>I-HbV を投与 (0.1 or 1400 mg Hb/kg) した。その結果、HbV 低投与量 (0.1 mg Hb/kg) においては、ABC 現象誘発の原因となる抗 HbV IgM の産生が確認され、初回投与時と比較して、2 回目投与時には著しい血中滞留性の低下とともに、肝臓及び脾臓による CL<sub>uptake</sub> の有意な増大が観察された。一方、HbV 高投与量 (1400 mg Hb/kg) では、抗 HbV IgM の産生は確認されたものの、MPS による取り込みの飽和により、低投与量において観察された血中滞留性の低下は有意に抑制された。また、抗 HbV IgM の認識部位は HbV 脂質膜構成成分の DSPE-PEG であった。最後に、出血性ショックのモデルラットを用いて、HbV の単回及び連続投与における体内動態を検討したところ、出血性ショック時の消失半減期は健常時に比べ短縮したが、2 回目投与時の消失半減期は単回投与时に比べ延長し、健常時と同レベルまで回復した。さらにこれらの結果に基づき、ヒトにおける HbV の半減期をアロメトリック式を用い算出したところ約 3-4 日と予想された。以上の結果から、薬理試験で示されていた HbV の安全性及び有効性を、我々は体内動態特性の観点より明らかにした。

### Abstract

Hemoglobin vesicles (HbV) have been developed as a cellular type of oxygen carrier, in which highly concentrated hemoglobin (Hb) is encapsulated in a phospholipid bilayer membrane with polyethylene glycol (PEG) and the diameter of HbV can be tailored to approximately 250 nm. Despite evidence for many types of effectiveness of HbV evaluation, including formulation test

(1) 熊本大学大学院医学薬学教育部 〒862-0973 熊本市大江本町 5-1 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan.

(2) 熊本大学育薬フロンティアセンター Center for Clinical Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

(3) 崇城大学薬学部 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University

論文受付 2009 年 11 月 4 日 論文受理 2009 年 12 月 3 日

and pharmacological test, the pharmacokinetics of HbV have not been well characterized. Therefore, we examined the pre-clinical pharmacokinetic studies of HbV. Using HbV in which the internal Hb was labeled with iodine-125(<sup>125</sup>I-HbV) and cell-free <sup>125</sup>I-Hb, it was found that encapsulation of Hb increased the half-life by 30 times, accompanied by a decreased distribution in both the liver and kidney. The uptake clearances for the liver and spleen were decreased with increasing dose of HbV, and the half-life of HbV was increased up to approximately 19 hours at a dose of 1400 mg Hb/kg. The pharmacokinetics of HbV components (internal Hb and liposomal lipid) were also investigated using <sup>125</sup>I-HbV and <sup>3</sup>H-HbV (liposomal cholesterol was radiolabeled with tritium-3(<sup>3</sup>H)). Similar plasma concentration curves of <sup>125</sup>I-HbV were observed for <sup>3</sup>H-HbV, and time course for the plasma iron concentration curve derived from HbV was consistent with the plasma concentration curves for both labeled-HbV. <sup>125</sup>I-HbV and <sup>3</sup>H-HbV were mainly distributed to the liver and spleen. In an *in vitro* study, the specific uptake and degradation of HbV in RAW 264.7 cells was observed, but this was not the case for parenchymal and endothelial cells. After degrading HbV in liver and spleen, internal Hb disappeared from both the liver and spleen 5 days after injection, and the liposomal cholesterol disappeared at about 14 days. Internal Hb was excreted into the urine and cholesterol into feces via biliary excretion. To examine whether HbV induces the Accelerated Blood Clearance(ABC) phenomenon in mice, at 7 days after the first injection of non-labeled HbV(0.1 or 1400 mg Hb/kg) the mice received <sup>125</sup>I-HbV(0.1 or 1400 mg Hb/kg). At a dose of 0.1 mg Hb/kg, <sup>125</sup>I-HbV was rapidly cleared from the circulation and uptake clearances in liver and spleen were significantly increased, and at this time, IgM against HbV was produced. In contrast, at a dose of 1400 mg Hb/kg, the pharmacokinetics of HbV were negligibly affected by repeated injection despite the production of IgM against HbV. This is due to the saturation of phagocytic processing by the mononuclear phagocyte system. In addition, the recognition site was determined to be DSPE-PEG in HbV. Next, we investigated the pharmacokinetics of single versus repeated administration of HbV during hemorrhagic shock. The half-life was shorter in hemorrhagic shock rats as comparison with normal rats, but it returned to levels similar to those of normal rats after the second HbV injection in hemorrhagic shock rat. Finally, the half-life of HbV in humans was estimated to be approximately 3-4 days using an allometric equation. We could determine the detailed pharmacokinetics properties of HbV, and our results suggest that HbV could be used as an oxygen carrier from the view point of pharmacokinetic studies.

#### Keywords

hemoglobin based oxygen carrier, pharmacokinetic, accelerated blood clearance(ABC)phenomenon, anti-HbV IgM, hemorrhagic shock, extrapolation

#### はじめに

通常, 生体内においてヘモグロビン(Hb)は赤血球内に存在し, 主に酸素運搬の役割を担っている。現代の医療において, 不慮の事故や手術中の大量出血時には赤血球濃厚液の投与が行われているが, 既知のAIDSや肝炎ウィルス及び未知のウェストナイルウィルスなどの感染症に加え, 血液型不一致等の医療過誤を引き起こす可能性が否定できない。さらには, 日本における赤血球濃厚液の保存期間は採血後, 冷蔵で3週間という短い期間であるなどといった様々な問題点が残されている。このような問題を克服するために, これまでにパーフルオロカーボン(Perfluorocarbon; PFC)や非細胞型及び細胞型Hb-based oxygen carrier(HBOCs)などの人工酸素運搬体の開発が進められてきた<sup>1,2)</sup>。

Hb小胞体(hemoglobin vesicle; HbV)は直径約250nmの均一な粒径リン脂質二分子膜より構成される小胞体中に, ヒト赤血球由来の精製Hbを高濃度で内包させた細胞型HBOCsである。これまでにアルブミンを添加することにより膠質浸透圧の調節が可能であること, さらには, アロステリック因子としてPyridoxal 5'-phosphateを共封入することによる酸素分圧の調節が可能であることなど, 赤血球と同等の物理化学的特性を付加することができることが報告されている<sup>3,4)</sup>。また, ポリエ

チレングリコール(PEG)を粒子表面へ導入することにより, 小胞体粒子間の凝集抑制と分散安定性が向上し, 溶液状態で2年以上の室温保存を可能にしただけでなく, 細網内皮系細胞(MPS)からの捕捉を抑制できることが報告されている<sup>5,6)</sup>。同時に, ヒト赤血球からHbVの原料となるHbの精製段階におけるウィルスの除去及び不活化工程に関しても数多くの検討がなされ, 高い安全性が確保されつつあると言える<sup>7,8)</sup>。この物理化学的検討に加え, 薬理効果についても, ラットを用いた50%出血ショックモデルの蘇生などの動物試験において, 赤血球と同等の効果を有することが証明されており, 今後の臨床応用が期待されている<sup>9,11)</sup>。

一般に, 医薬品の開発過程の中で, 前臨床試験として製剤化試験, 薬理試験, 薬物動態試験, さらには安全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。2008年, Journal of American Medical Association(JAMA)誌において, 欧米で開発されたHemAssist, Hemopure, Hemolink, PolyHeme, Hemospanの5種類の非細胞型HBOCsの臨床試験結果を基に, メタアナリシスを行ったところ, 非細胞型HBOCs投与群の死亡率および心筋梗塞発症率が対照群に比べ高いというエビデンスが報告された。これを受けNatansonらは人工酸素運搬体の開発過程で動物試験における十分な検討が

必要であると指摘しており、以前にもまして、さらなる前臨床試験とその解釈の重要性が求められるようになった<sup>12)</sup>。

前述したように、HbV の有用性は数多くの前臨床試験において確認されているが、前臨床試験で必要不可欠な検討項目の 1 つである体内動態に関する情報は不足している。1997 年、Kennedy は、新薬開発断念の理由に不十分な薬物動態試験が大きく関与していることを報告している<sup>13)</sup>。これは薬物動態試験がただ単なる、薬物の吸収(Absorption)・分布(Distribution)・代謝(Metabolism)・排泄(Excretion)といった、いわゆる ADME を把握するだけでなく、これらのデータを踏まえた上で薬理効果や毒性発現を予測すること、つまり有効性や副作用を考える上で有用であるからである。実際に、過去に開発された人工酸素運搬体の一つである PFC は、その有用性が *in vivo* 及び *in vitro* 試験において証明されたが、クリアランス(排泄)の悪さから、1 年以上にわたる臓器蓄積(特に肺)が原因となる副作用が確認された<sup>14)</sup>。この問題は体内動態試験の結果から十分に予想できたと思われる。また、リポソーム製剤は上市されるようになって日が浅いため、従来の製剤に比べて体内動態についても不明な点が残されている。加えて HbV の場合、赤血球代替物であるため投与量が通常のリポソーム製剤の 100 倍以上と多く、これまでの構築してきた動態解析の成果を当てはめることができない。そのため、予期せぬ副作用や生体蓄積性が懸念されると同時に、新たに HbV の臨床使用状況でデータを構築する必要がある。

現在、上市されている Amphotericin B 内封リポソーム製剤(AmBisome®)は健常人と病態患者によって体内動態が一部異なることが報告されている<sup>15,16)</sup>。また、PEG 修飾リポソームにおいて、ある投与間隔で 2 回投与を行うと 2 回目投与された PEG 修飾リポソームの血中クリアランスが亢進するといった、いわゆる Accelerated Blood Clearance Phenomenon(ABC 現象)が誘導されることが報告されている<sup>17)</sup>。そのため、PEG 修飾リポソーム製剤である HbV においても健常時と病態時(大量出血時)、また頻回投与時において体内動態が異なる可能性が懸念され、そのような条件をふまえて HbV の体内動態特性を把握することは HbV を安全かつ有効に臨床使用するために重要であると考えられる。

本稿では、我々がこれまで明らかにしてきた HbV の体内動態特性について紹介する。

## 1 Hb 及び HbV の体内動態解析<sup>18)</sup>

通常、溶血により血漿中へ放出された Hb は血漿タンパク質の一つであるハプトグロビンと結合することで、肝臓へ取り込まれる<sup>19)</sup>。ハプトグロビンと結合していない遊離型の Hb は、速やかに二量体へ解離し、糸球体のサイズバリアーを潜り抜けることで糸球体濾過をうけ、尿中へ排泄される。そこで、ddY 系雄性マウスに Hb 及び HbV の内部 Hb をヨウ素(<sup>125</sup>I)標識した <sup>125</sup>I-Hb あるいは <sup>125</sup>I-HbV を 1 mg Hb/kg で尾静脈内投与し、Hb を小胞体化することによる、体内動態の変化について検討した。

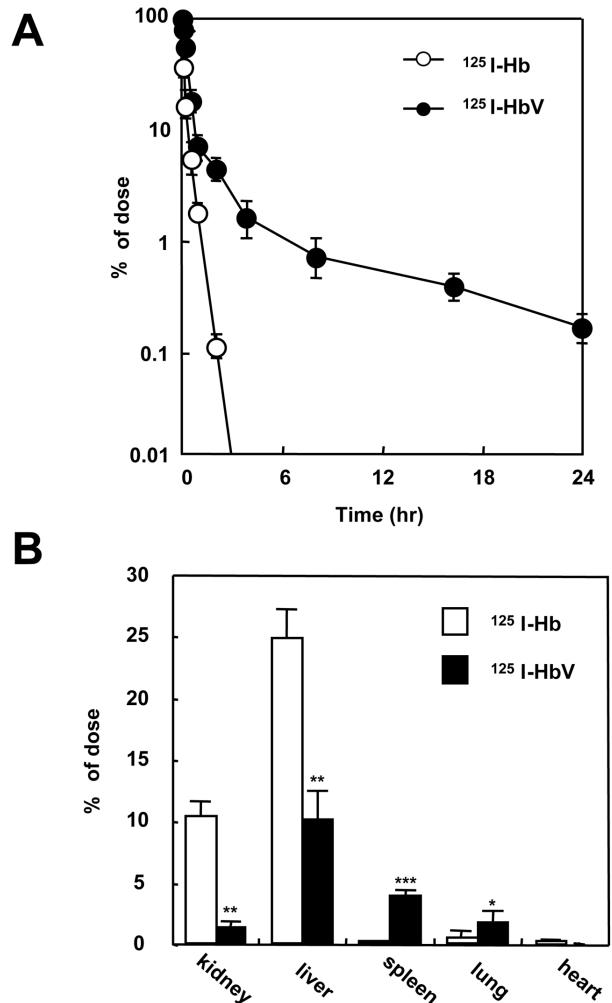


Fig. 1. A, Time course for the plasma level of <sup>125</sup>I-Hb( open circle )and <sup>125</sup>I-HbV( closed circle )after administration to mice. DdY mice received a single injection of <sup>125</sup>I-Hb or <sup>125</sup>I-HbV from the tail vein at a dose of 1 mg Hb/kg. Blood was collected from the inferior vena cava under ether anesthesia, and a plasma sample was obtained. Each point represents the mean ± SD( n=3-6 ) B, Tissue distributions of <sup>125</sup>I-Hb( open bar )and <sup>125</sup>I-HbV( filled bar )at 3 min after administration to mice. DdY mice received a single injection of <sup>125</sup>I-Hb or <sup>125</sup>I-HbV from the tail vein at a dose of 1 mg/kg. At 3 min after injection, each organ was collected. Each bar represents the mean ± SD( n=3-6 ) \* p<0.05, \*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001 vs <sup>125</sup>I-Hb.

<sup>125</sup>I-Hb 及び <sup>125</sup>I-HbV を 1 mg Hb/kg で ddY マウスに尾静脈内投与後の血漿中濃度推移を Fig. 1A に示す。<sup>125</sup>I-Hb は投与後速やかに血漿中より消失するのに対して、<sup>125</sup>I-HbV は長時間滞留し、半減期( $t_{1/2}$ )は、約 30 倍に延長していた( $t_{1/2}$ ;  $3.1 \pm 1.0$ ,  $0.1 \pm 0.1$  hr,  $p < 0.01$ , for <sup>125</sup>I-HbV and <sup>125</sup>I-Hb, respectively)。それに伴い、<sup>125</sup>I-HbV の血漿中濃度-時間曲線下面積(AUC)は <sup>125</sup>I-Hb に比べ約 3 倍増大し、一方で全身クリアランス(CL)は有意に減少した(AUC;  $29.4 \pm 9.2$ ,  $7.9 \pm 3.9$  hr \* % of dose/mL,  $p < 0.001$  and CL;  $3.4 \pm 0.1$  mL/hr,  $12.7 \pm 2.1$  mL/hr,  $p < 0.001$ , for <sup>125</sup>I-HbV and <sup>125</sup>I-Hb, respectively)。この際の投与 3 分後の主要臓器への分布を Fig. 1B に示す。<sup>125</sup>I-HbV は <sup>125</sup>I-Hb

と比較して、腎臓及び肝臓への移行が著しく抑制されるとともに、 $^{125}\text{I}$ -Hbにおいてほとんど分布していなかった脾臓や肺への移行が有意に増大した。

この現象は、血漿中において極めて不安定であったHbを小胞体化することで、ハプトグロビンとの結合の抑制、血漿中のHbの解離及び排泄の抑制、つまり、肝臓及び腎臓におけるHbVの取り込みが有意に抑制されたため、血中滞留性が大幅に改善されたと解釈される。また、リボソーム製剤はMPSにより取り込み・分解を受けるため、HbVは脾臓・肺マクロファージに取り込みを受けた結果、脾臓・肺への分布量が増大したのではないかと推察される。

## 2 HbV体内動態に及ぼす投与量依存性<sup>18)</sup>

マウスにおける $^{125}\text{I}$ -HbVの体内動態の投与量依存性について、投与量を1, 10, 200 mg Hb/kg及び臨床使用量の目安とされる1400 mg Hb/kgに設定して検討した。Fig. 2にマウスに静脈内投与後の血漿中濃度推移を示す。投与量の増大とともに血中滞留性は向上し、 $t_{1/2}$ は1400 mg Hb/kgの投与量において、約19時間まで延長した( $t_{1/2}$ : 3.1 ± 3.1, 3.6 ± 1.3, 7.2 ± 3.1 and 18.8 ± 1.3 hr at doses of 1, 10, 200 and 1400 mg Hb/kg, respectively)。ラットにおいても同様の検討を行ったところ、投与量増大に伴い血中滞留性は向上した( $t_{1/2}$ : 8.8 ± 0.7, 11.5 ± 0.3 and 30.6 ± 4.0 hr at doses of 10, 200 and 1400 mg Hb/kg, respectively)。

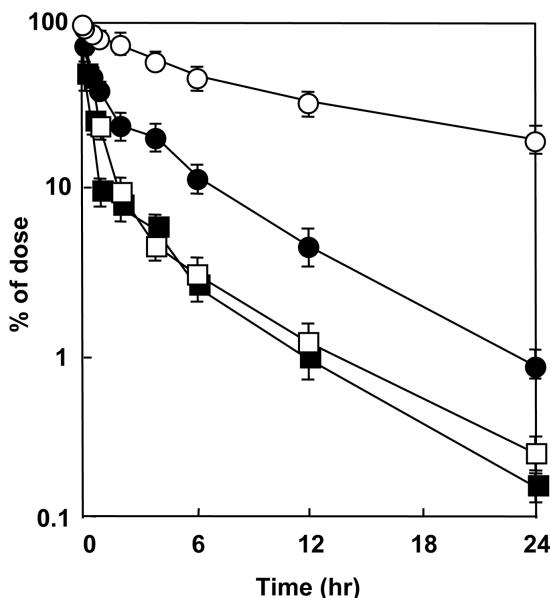


Fig. 2. Dose-dependent plasma concentration curve of  $^{125}\text{I}$ -HbV after administration of  $^{125}\text{I}$ -HbV in mice. All mice received a single injection of  $^{125}\text{I}$ -HbV at a dose of 1 (closed square) 10 (open square) 200 (closed circle) and 1400 mg Hb/kg (open circle) containing 5% rHSA. At each time(0.05, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hr) after the  $^{125}\text{I}$ -HbV injection, blood samples were collected from the inferior vena cava, and a plasma sample was obtained. Each parameter was calculated by MULTI using a two-compartment model. Each point represents the mean ± SD(n=3-6)

次に1400 mg Hb/kgの投与量で $^{125}\text{I}$ -HbVをマウスに静脈内投与し、8時間後における各臓器の組織対血漿中濃度比( $K_p$ )を算出したところ、肝臓及び脾臓においてのみ $K_p$ 値は、1より大きくなり(1.8, 2.8 mL/g of tissue for liver and spleen, respectively)，肝臓及び脾臓に高い濃度で蓄積することが示唆された。そこで、肝臓、脾臓について、 $^{125}\text{I}$ -HbVの分布の投与量依存性を検討したところ、肝臓において、1, 10 mg Hb/kgの投与量では、投与30分後までに30%以上の高い分布が認められたが、投与量の増大とともに分布の程度は減少し、1400 mg Hb/kgにおいて肝臓へ分布した割合は数%にまで阻害された(Fig. 3A)。分布量の程度は異なるものの、同様の傾向が脾臓においても認められた(Fig. 3B)。また、各臓器の $^{125}\text{I}$ -HbV取り込みクリアランス(CL<sub>uptake</sub>)を算出したところ、肝臓、脾臓において、CL<sub>uptake</sub>は投与量依存的に減少し、腎臓、肺及び心臓においてはこのような傾向は認められなかった(Table 1)。以上のことより、HbVの消失には肝臓、脾臓が主要な役割を果たしていること、また、これら臓器への分布に投与量に依存した飽和現象が観察されたことから、HbVの臓器取り込み過程には輸送担体が関与している可能性が示された。

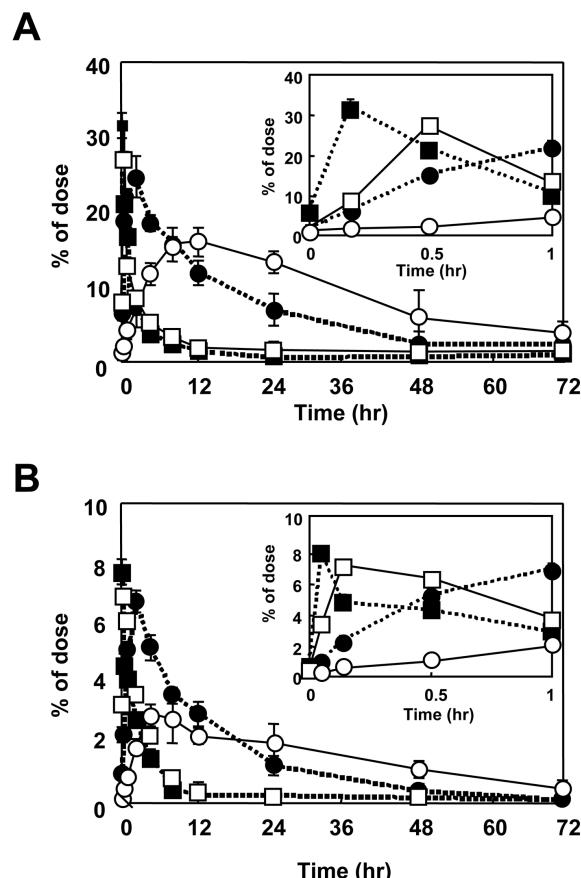


Fig. 3. Time dependent distribution of  $^{125}\text{I}$ -HbV to liver(A) and spleen(B) after administration of  $^{125}\text{I}$ -HbV in mice. All mice received a single injection of  $^{125}\text{I}$ -HbV at a dose of 1 (closed square) 10 (open square) 200 (closed circle) and 1400 mg Hb/kg (open circle) containing 5% rHSA. At each time after injection, the liver and spleen was collected. Each point represents the mean ± SD(n=3-6)

Table 1. Dose-dependent uptake clearance of HbV in liver, spleen, kidney, lung and heart after  $^{125}\text{I}$ -HbV administration in mice

All mice received a single injection of  $^{125}\text{I}$ -HbV (1, 10, 200 and 1400 mg Hb/kg) containing 5% rHSA. The uptake clearance for each organ was calculated by integration plot analysis at designated times from 1 min to 30 min after injection.

dose (mg/kg)	CL <sub>uptake</sub> ( $\mu\text{L}/\text{hr}$ )				
	liver	spleen	kidney	lung	heart
1	2608 ± 654	1018 ± 188	19 ± 9.4	3.5 ± 0.9	0.14 ± 0.06
10	1473 ± 440	786 ± 94	18 ± 8.1	2.5 ± 0.2	0.38 ± 0.09
200	452 ± 114	102 ± 36	25 ± 9.2	1.3 ± 0.2	0.06 ± 0.02
1400	256 ± 37	51 ± 6.1	27 ± 9.4	0.6 ± 0.2	0.14 ± 0.06

The values are mean ± S.D. (n=3-6).

そこで、初代肝実質及び肝内皮細胞、さらにはクッパー細胞の代替としてマウス単球由来マクロファージであるRAW 264.7細胞を用い、HbVの取り込みに関与する細胞腫の探索を行ったところ、初代肝実質及び肝内皮細胞において、 $^{125}\text{I}$ -HbVの特異的な取り込みは認められなかつたが、RAW 264.7細胞においてのみ、 $^{125}\text{I}$ -HbVの特異的な取り込みと分解が認められた。また、RAW 264.7細胞における $^{125}\text{I}$ -HbVの取り込みに飽和現象がみられたことから、肝臓及び脾臓への取り込みにはクッパー細胞及び脾臓マクロファージの関与が明らかとなった。先述したように、リポソーム製剤は肝臓や脾臓などのMPSによって取り込まれ易く<sup>20)</sup>、この過程には、補体系活性化によるリポソームのオプソニン化が関与すると考えられている。また、リポソーム製剤の取り込み経路としてはCD14、CD36、CD51/61などのスカベンジレセプターを介した経路も報告されている<sup>21)</sup>。さらに我々は最近、補体系を不活性させた培養液中において、RAW 264.7細胞によるHbVの特異的な取り込まれることを見出しており、HbVの肝臓及び脾臓への取り込み過程には補体系活性化による経路に加えて、スカベンジレセプターなどが一部関与している可能性が示唆された。

### 3 HbV構成成分の体内動態解析<sup>18)</sup>

人工酸素運搬体は赤血球代替物であるため通常の薬剤とは異なり、一度に大量投与される。そのため、一般的な薬物に比べて予期せぬ副作用や生体内蓄積性を示すことが懸念される。特にHbVの構成成分であるHbは腎傷害、高血圧の原因となり<sup>22)</sup>、脂質膜成分（特にコレステロールの蓄積）は腎臓や心血管疾患のリスクファクターに成り得る<sup>23)</sup>。そこで、HbVの内部Hb及び膜構成成分の一つであるコレステロールをそれぞれ $^{125}\text{I}$ 及びトリチウム（ $^3\text{H}$ ）で標識したHbV（ $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbV）を用い、臨床推奨量とされる1400 mg Hb/kgでddYマウス及びSDラットに投与し、HbV構成成分の詳細な体内動態的特性の検討を行った。

ddYマウスに $^{125}\text{I}$ -HbVあるいは $^3\text{H}$ -HbVを静脈内投与後の $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVはほぼ同様の血漿中濃度推移を示し、濃度推移曲線より得られた体内動態パラメータもほぼ一致した。さ

に原子発光分析法を用いて、Hb構成元素であるヘム鉄の血漿中濃度を併せて測定したところ、 $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVの推移とよく一致した。これらの結果は、HbVが血中に分解を受けることなく、小胞体構造を保持した形で血中を循環していることを強く示唆している。

また、 $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVとともに、HbVの主要分布臓器である肝臓及び脾臓に分布していた。そこで、肝臓及び脾臓における経時的な分布推移の検討を行い、CL<sub>uptake</sub>を算出したところ、 $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVでよく一致し（Liver; 256 ± 37, 301 ± 41; Spleen; 51 ± 6, 43 ± 12  $\mu\text{L}/\text{hr}$ , for  $^{125}\text{I}$ -HbV and  $^3\text{H}$ -HbV, respectively），HbVは小胞体構造を保持した形で臓器へ取り込まれることが示唆された。しかしながら体内分布を経時に確認したところ、投与数時間後からの $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVの挙動は明らかに異なった。すなわち、 $^{125}\text{I}$ -HbV投与では7日以内に放射活性が臓器中から消失したが、 $^3\text{H}$ -HbV投与においては14日後まで活性が認められた。このことより、HbVは肝臓及び脾臓において、脂質成分とHbに分解され、それぞれの代謝、排泄経路は異なることが示唆された。

そこで $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVの排泄経路について調べた結果、 $^{125}\text{I}$ -HbV投与時ではその放射活性の84%が7日以内に尿中へ排泄されたのに対して、糞中への排泄は数%であった。一方、 $^3\text{H}$ -HbVは70%以上が糞中に排泄されていた。また、胆汁中にも $^3\text{H}$ 活性が認められたため、脂質成分は分解された後、胆汁中から糞中へ排泄されることが示唆された。加えて、SDラットに $^{125}\text{I}$ -HbV及び $^3\text{H}$ -HbVを1400 mg Hb/kgで投与し、同様の検討を行ったところ、マウスと同様の挙動を示した。

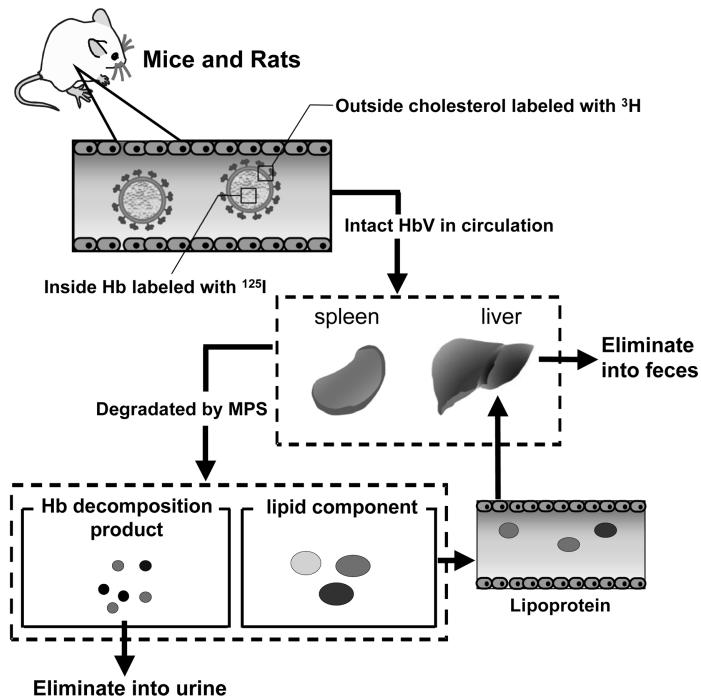


Fig. 4. Representation of a sequence of HbV disposition, metabolism and excretion from pharmacokinetic examinations using  $^{125}\text{I}$ -HbV and  $^3\text{H}$ -HbV.

これらの検討により、HbVは小胞体構造を保持した状態で血中を循環し、小胞体構造を保持したまま、主に肝臓・脾臓に存在するMPSに取り込まれ分解をうけると結論付けた。また、HbV分解後では内部Hbと脂質成分の挙動は異なり、前者は臓器においてアミノ酸レベルまで分解を受けた後に、速やかに臓器から消失し、主に尿中に排泄されるのに対して、脂質膜成分は臓器に一時的な蓄積性を示し、その大部分は胆汁中から糞中へ排泄される一連の体内動態特性が明らかとなった(Fig. 4)。これらの結果は、HbVが臨床使用量とされる1400 mg Hb/kgという大量投与された場合においても、生体蓄積性が少なく、また、内因性のHbや脂質成分と同様の経路で代謝排泄されることを示唆しており、HbVが代謝・排泄性に優れていることが強く示唆された。しかしながら、今回の標識体は内部Hbのグロブリン蛋白または脂質膜構成成分のコレステロールを標識したものであるため、今後、内部Hb中のヘムや他の脂質膜構成成分(リン脂質など)の動態特性に関しても詳細な検討を行う必要があると考えられる。

#### 4 HbVによるABC現象の誘導<sup>24)</sup>

HbVを現行の輸血代替として使用されることを想定した場合、同一患者へ繰り返し投与される状況は十分に想定される。近年、リポソーム製剤、特にPEG修飾リポソームにおいて、2回目に投与したPEG修飾リポソームのCLが1回目投与時と比べて著しく増大する、いわゆるABC現象が幅広く認識され<sup>17)</sup>、リポソーム製剤を上市する際には頻回投与時における体内動態特性の変化について理解することが重要であると考えられる。そこで、PEG修飾新規リポソーム製剤であるHbVにおいても、ABC現象が誘導されるか否かについて検討した。

マウスに非標識HbVを用いて、一般にPEG修飾リポソーム製剤でABC現象が誘導されると知られている低投与量(0.1 mg Hb/kg)及びHbVの臨床推奨量である高投与量(1400 mg Hb/kg)を静脈内投与し、初回投与7日後に再び同じ投与量の<sup>125</sup>I-HbVを投与したところ、低投与量(0.1 mg Hb/kg)時では、2回目に投与した<sup>125</sup>I-HbVが速やかに血漿中から消失した。この時、CLは著しく増大し、ABC現象の誘導が確認された(Fig. 5A)(CL; 3.69 ± 0.4 and 22.3 ± 8.1 mL/hr, p < 0.001, for the first and second injections, respectively).一方、高投与量(1400 mg Hb/kg)時は、2回目に投与した<sup>125</sup>I-HbVの血中CLの増大は確認されず、ABC現象は誘導されなかった(Fig. 5B)(CL; 0.12 ± 0.04 and 0.14 ± 0.05 mL/hr, not significantly, for the first and second injections, respectively)

ABC現象の誘導には、クッパー細胞による取り込み量の増大が観察されることが報告されていることから<sup>25)</sup>、肝臓への分布を投与後72時間まで追跡した。その結果、低投与量(0.1 mg Hb/kg)群の場合、初回投与時は、投与後3分で投与量の10%程度が分布したのに対し、2回目投与では投与量の50%以上が分布していた。この変化は、CL<sub>uptake</sub>にも有意な差として反映された(CL<sub>uptake</sub>; 3.5 ± 0.4 and 29.6 ± 18 mL/hr, p < 0.01, for the first and the second injection, respectively)。

対称的に、高投与量(1400 mg Hb/kg)時では、CL<sub>uptake</sub>のわずかな増大が確認されたものの、低投与量(0.1 mg Hb/kg)時のような有意な変化は確認されなかった(CL<sub>uptake</sub>; 0.26 ± 0.04 and 0.37 ± 0.03 mL/hr, p < 0.05, for the first and the second injection, respectively)。

これまでの報告によると、ABC現象の誘導には初回投与に呼応して脾臓から分泌されたIgM抗体が2回目投与されたPEG修飾リポソームに結合する結果、クッパー細胞に認識され易くなり、取り込み量の増加と、それに伴う血中滞留性の減少といった一連のメカニズムが提唱されている<sup>26)</sup>。そこで、HbV

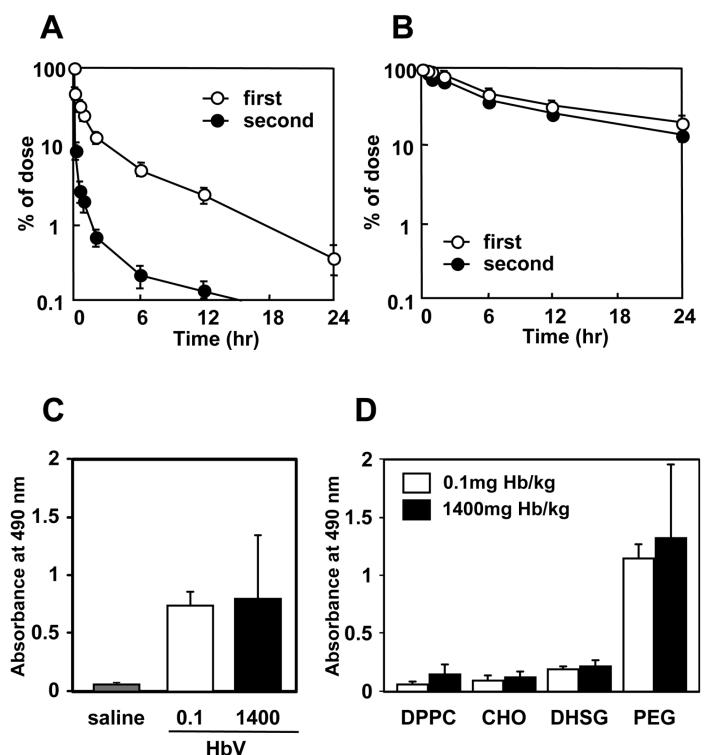


Fig. 5. Plasma concentration curve of <sup>125</sup>I-HbV after the first injection (open circle) or the second injection (closed circle) of <sup>125</sup>I-HbV to mice at a dose of 0.1 mg Hb/kg(A) or 1400 mg Hb/kg(B) Male ddY mice received a single injection of a non-labeled HbV suspension or <sup>125</sup>I-HbV to the tail vein at a dose of 0.1 or 1400 mg Hb/kg. Seven days after the first injection of the non-labeled HbV suspension, the same ddY mice received the <sup>125</sup>I-HbV suspension to the tail vein. Blood was collected from the inferior vena cava under ether anesthesia, and plasma was obtained. Each point represents the mean ± SD (n=3-6) C, Determination of IgM against HbV after a single intravenous injection of saline (gray bars) HbV at a dose of 0.1 mg Hb/kg (open bars) or 1400 mg Hb/kg (closed bars) in mice. D, Determination of the specific recognition site of IgM against HbV after a single intravenous injection of HbV at a dose of 0.1 mg Hb/kg (open bars) or 1400 mg Hb/kg (closed bars) in mice. DdY mice were injected with saline or HbV (0.1 or 1400 mg Hb/kg) to the tail vein. At 7 day after injection of saline or HbV, blood was collected from the inferior vena cava, and plasma was obtained. IgM against HbV and each lipid component were detected with ELISA. Each bar represents the mean ± SD (n=4)

低投与量 (0.1 mg Hb/kg) 及び高投与量 (1400 mg Hb/kg) 時において抗HbV IgM産生に関する検討を行ったところ、興味深いことにABC現象の誘導されなかつた高投与量 (1400 mg Hb/kg) 時においても、抗HbV IgMの産生が確認された (Fig. 5C). さらに、抗HbV IgMの認識部位を特定するためにHbVの脂質膜構成成分別に検討を行つたところ、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-PEG (DSPE-PEG) にのみ特異的に結合することが判明した (Fig. 5D), この結果はIshidaらのPEG修飾空リポソームにおける報告とよく一致した<sup>27)</sup>. つまり、高投与量 (1400 mg Hb/kg) 時において、抗HbV IgMの産生が確認されたにも関わらず、ABC現象が誘導されなかつた現象は、クッパー細胞によるHbVの取り込み過程に飽和が生じたためと推察される. 事実、上述したように、HbVの高投与量時には肝臓における取り込み過程に飽和が確認されている<sup>18)</sup>.

以上の結果から、臨床想定される高投与量 (1400 mg Hb/kg) 条件下では、頻回投与によるABC現象は見掛け上誘導されず、薬理効果への影響は少ないものと考えられるが、安全な投与設計を確立するためには、今後、様々な病態で同様の検討を行い、データを構築していく必要がある.

## 5 出血性ショックモデルラットにおけるHbVの体内動態解析<sup>28)</sup>

現在上市されているリポソーム医薬のAmphotericin B内封リポソーム製剤は健常人と病態患者によって体内動態が異なることが報告されている<sup>15,16)</sup>. このことは、同じリポソーム製剤であるHbV投与時においても健常時と病態時（大量出血時）で体内動態特性が異なる可能性が推察される. そこで、大量出血時（40%脱血）に誘発される出血性ショックモデルラットにおいてHbVの体内動態実験を行つた.

まず初めに、出血性ショックモデルラットに<sup>125</sup>I-HbVを1400 mg Hb/kgで投与後の血漿中濃度の変化を検討した. その結果、健常時に比べ出血性ショック時において投与初期から急激な血漿中濃度の低下が確認された (Fig. 6). 血漿中濃度推移曲線より各速度論パラメータを算出したところ、健常群と比較すると出血性ショック群では $t_{1/2}$ が約2/3倍に減少し ( $30.6 \pm 4.0$  and  $18.1 \pm 3.7$  hr,  $p < 0.01$ , for normal and hemorrhagic shock, respectively), それに伴つて, CLの有意な増加 ( $0.47 \pm 0.04$  and  $0.80 \pm 0.08$  mL/hr,  $p < 0.01$ , for normal and hemorrhagic shock, respectively) が確認された. 興味深いことに、初期血漿中濃度及び中枢コンパートメントの分布容積は両群間で同じ値を示したが、末梢コンパートメントの分布容積 ( $V_2$ ) は出血性ショック群で約2倍に増加した. また、中枢と末梢のコンパートメント間の移行性を示す $k_{12}/k_{21}$ の値は健常群では約0.6であるのに対して、出血性ショック時では約1.2であり1より大きくなつた. これら $V_2$ や $k_{12}/k_{21}$ 値の増大より、出血性ショック時には組織への移行性が亢進していることが強く示唆された. そこで、次にHbVの各臓器（腎臓、肝臓、脾臓、肺、心臓）への経時的な分布推移について検討したところ、健常群に

比べ、出血性ショック群の方が、投与初期から臓器分布が亢進していた. これらの結果より、出血性ショック時において、HbVは臓器により多く移行することが確認された. また、出血性ショック群における<sup>125</sup>I-HbV投与時の糞中及び尿中排泄量の経時的な推移は、健常群と同様に主に尿中へ排泄され、糞中への排泄はほとんど確認されず、排泄量においても両群間に有意な違いが認められなかつた.

これらの結果から、出血性ショック時にはHbVの血中滞留性が短縮し、臨床有用性の低下が懸念されたが、このHbVの血中滞留性の短縮は、血中から臓器への移行性増大に伴う血漿中濃度の低下によるものと推察された. つまり、出血性ショック時においては、臓器中へのHbVの移行性が増大することにより、臓器中の低酸素状態を改善している可能性が示唆された.

ところで、大量出血の患者に対しては、目標Hb値まで上昇させるために濃厚赤血球製剤の頻回投与（約1時間間隔）を行つてゐるため、HbVが現行の輸血代替として機能することを想定した場合、同一患者への頻回投与が十分に想定される. 上述したようにリポソーム製剤の頻回投与にはABC現象の誘導が懸念される. そこで次に、出血性ショックモデルラットを用いてHbVを連続投与した場合の体内動態を検討した.

出血性ショックモデルラットに非標識HbVを1400 mg Hb/kgで投与し、1時間後に再び同量の<sup>125</sup>I-HbV (1400 mg Hb/kg) を投与した. その結果、出血性ショックモデルラットへ単回投与した時に比べ2回目投与した方が明らかな血中滞留性の向上が確認された (Fig. 6). また、各速度論パラメータを算出したところ、出血性ショックモデルラットへ単回投与した時には2回目投与した時より、 $t_{1/2}$ は約2倍に増加した ( $18.1 \pm 3.7$  and  $32.4 \pm 1.1$  hr,  $p < 0.01$ , for one-injection group and two-injection group, respectively). 興味深いことに、この出血性ショックモデルラットへ2回目投与した際の血漿中濃度推移と

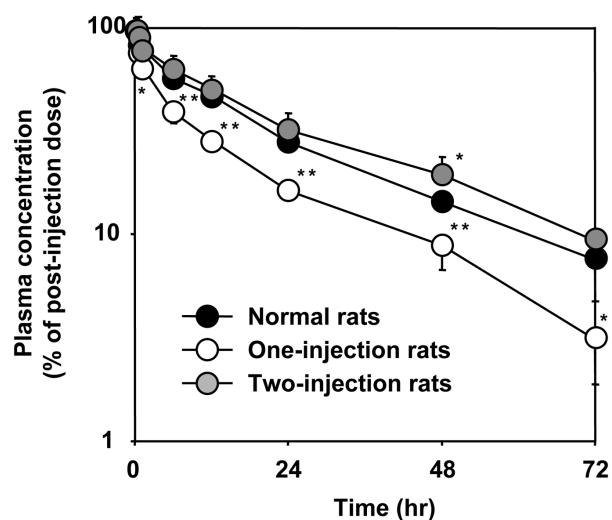


Fig. 6. Relative plasma concentration of <sup>125</sup>I-HbV after administration of 1400 mg Hb/kg via injection of normal, one-injection group or two-injection rats. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n=5)  
\* < 0.05 or \*\* < 0.01 vs. normal rats.

速度論パラメータは、健常ラット群の結果とよく類似していた。そこでこのことを確かめるために、出血性ショックモデルラットに単回及び2回目投与時ににおける各臓器（腎臓、肝臓、脾臓、肺、心臓）への経時的な分布推移を検討した。その結果、単回投与時に比べ、2回目投与時では投与後12時間まで臓器分布の減少が確認されたが、12時間を過ぎると、2回目投与した時の臓器分布が亢進していた。また、尿中及び糞中への排泄挙動を検討したところ、単回及び2回目投与した時では、<sup>125</sup>I-HbVの排泄経路に変化は確認されなかつたが、半減期の延長に伴い、2回目投与した時において排泄の遅延が観察された。加えて、出血性ショックモデルラットに非標識HbVを1400 mg Hb/kgで投与し、1時間後における抗HbV IgMの産生を調べたところ、その存在は観察されなかつた。

従って、出血性ショック時に現行の濃厚赤血球と同様にHbVを1時間間隔で連続投与しても、抗HbV IgMは産生されず、ABC現象は誘導されないことが確認された。興味深いことに、出血性ショック時の初回投与時に観察された血中滞留性の低下は2回目投与時には回復しており、また、初回投与時に比べて、2回目投与時では臓器へ持続的に分布し、排泄は遅延していた。このことから、出血性ショック時にHbVを2回目投与すると、初回投与によるMPSによる取り込みの飽和により、HbVは血中に長時間滞留することで、臓器への酸素供給を持続的に行う可能性が示唆された。

## 6 アニマルスケールアップ<sup>28)</sup>

HbVの臨床試験を想定した際、ヒトにおけるHbVの半減期の予測、いわゆるアニマルスケールアップは、投与設計を行う上で非常に有用である。そこで、上述したマウス・ラットの結果とSouらによる<sup>99m</sup>Tc-HMPAO内封HbVを用いたウサギにおけるHbVの体内動態結果<sup>29)</sup>を用いて、アロメトリック式（P =

· W P; pharmacokinetic parameters, W; body weight, ; coefficient, ; exponent）を作成し、ヒトにHbVを1400 mgHb/kgで投与した場合のHbVの半減期の予測を試みた（Fig. 7）。

その結果、ヒトにおける半減期は約96時間であると予測された。他のリポソーム製剤であるドキソルビシン封入リポソームの場合、ラットにおける半減期は35時間であるのに対して、ヒトにおいては56-90時間であった。また、経験的にリポソームのヒトにおける半減期はラットの約2-3倍であると言われており、今回の我々の結果ともよく対応していた<sup>30)</sup>。従って、今回の検討と過去の報告を総合的に解釈すると、ヒトにおけるHbVの半減期は約3-4日ではないかと予測される。

## おわりに

冒頭で述べたように、古くから前臨床試験段階における薬物動態試験の重要性が言われている。これは、薬物動態試験が、ただ単なる薬物のADMEを把握するだけでなく、薬効や副作用を予測するのに役立つからである。2008年、JAMA誌に報告された、非細胞型HBOCs投与群の死亡率および心筋梗塞発

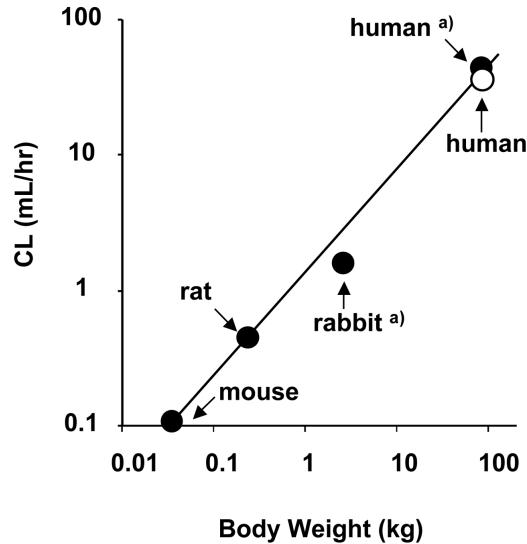


Fig. 7. Allometric relationships between body weight and clearance (CL). The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method ( $y=1.466x^{0.764}$ ,  $r^2=0.984$ ) The extrapolated human values based on a body weight of 70 kg (open circle) are also shown. <sup>a)</sup>Data from reference for Rabbit, and we calculated the human CL using  $K_{el}$ , which is from Sou et al.<sup>11)</sup> and our estimated  $V_{d}$ .

症率が対照群に比べ高いことや<sup>12)</sup>、PFCが、1年以上にわたる臓器蓄積（特に肺）により副作用が確認されたことは<sup>14)</sup>、体内動態試験を初め、その他の試験から総合的に判断することで十分に予想できたのではないかと感じる。これらの教訓を生かし、薬物動態試験を含め、様々な前臨床試験結果を基に、HbVの安全性及び有効性を総合的に判断し、日本だけで開発が進められている細胞型HBOCsの一つであるHbVの臨床使用に向けた最終試験を進めていく必要性があるだろう。

## 参考文献

- Keipert PE. Use of Oxygent, a perfluorochemical-based oxygen carrier, as an alternative to intraoperative blood transfusion. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1995; 23: 381-394.
- Winslow RM. Targeted O<sub>2</sub> delivery by low-P<sub>50</sub> hemoglobin: a new basis for hemoglobin-based oxygen carriers. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2005; 33: 1-12.
- Teramura Y, Kanazawa H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Prolonged oxygen-carrying ability of hemoglobin vesicles by coencapsulation of catalase in vivo. Bioconjug Chem 2003; 14: 1171-1176.
- Sakai H, Cabrales P, Tsai AG, Tsuchida E, Intaglietta M, Oxygen release from low and normal P<sub>50</sub> Hb vesicles in transiently occluded arterioles of the hamster window model. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 288: H2897-2903.
- 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. *Bioconjug Chem* 1997; 8: 23-30.
6. Sakai H, Tomiyama KI, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug Chem* 2000; 1: 425-432.
  7. Abe H, Ikebuchi K, Hirayama J, Fujihara M, Takeoka S, Sakai H, Tsuchida E, Ikeda, H. Virus inactivation in hemoglobin solution by heat treatment. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001; 29: 381-388.
  8. Huang Y, Takeoka S, Sakai H, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H, Tsuchida E. Complete deoxygenation from a hemoglobin solution by an electrochemical method and heat treatment for virus inactivation. *Biotechnol Prog* 2002; 18: 101-107.
  9. 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: 289-297.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 299: 2304-2312.
  13. Kennedy, T. Managing the drug discovery/development interface. *Drug Discovery Today* 1997; 2: 436-444.
  14. Nose Y. Is there a role for blood substitutes in civilian medicine: a drug for emergency shock cases? *Artif Organs* 2004; 28: 807-812.
  15. Walsh TJ, Yeldandi V, McEvoy M, Gonzalez C, Chanock S, Freifeld A, Seibel NI, Whitcomb PO, Jarosinski P, Boswell G, Bekersky I, Alak A, Buell D, Barret J, Wilson W. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B( AmBisome )in neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2391-2398.
  16. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Kline S, Buell DN, Walsh TJ. Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of <sup>14</sup>C after administration of <sup>14</sup>C-cholesterol-labeled AmBisome to healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2001; 41: 963-971.
  17. Ishida T, Harada M, Wang XY, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes. *J Control Release* 2005; 105: 305-317.
  18. 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; 37: 1456-1463.
  19. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409: 198-201.
  20. Kiwada H, Matsuo H, Harashima H. Identification of proteins mediating clearance of liposomes using a liver perfusion system. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 32: 61-79.
  21. Shibuya-Fujiwara N, Hirayama F, Ogata Y, Ikeda H, Ikebuchi, K. Phagocytosis in vitro of polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin by human peripheral blood monocytes plus macrophages through scavenger receptors. *Life Sci* 2001; 70: 291-300.
  22. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, Balla, G. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 1030-1043.
  23. Groneand EF, Grone HJ. Does hyperlipidemia injure the kidney? *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4: 424-425.
  24. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kadokawa D, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri, M. Hemoglobin vesicles, PEGylated liposomes developed as a red blood substitute, do not induce the accelerated blood clearance phenomenon in mice. *Drug Metab Dispos* 2009; 37: 2197-2203.
  25. Ishida T, Ichikawa T, Ichihara M, Sadzuka Y, Kiwada H. Effect of the physicochemical properties of initially injected liposomes on the clearance of subsequently injected PEGylated liposomes in mice. *J Control Release*. 2004; 95: 403-412.
  26. Ishida T, Kiwada H. [ Accelerated blood clearance( ABC ) phenomenon induced by administration of PEGylated liposome ] *Yakugaku Zasshi* 2008; 128: 233-243.
  27. Ishida T, Ichihara M, Wang X, Yamamoto K, Kimura J,

- Majima E, Kiwada H. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 2006; 112: 15-25.
28. Taguchi K, Maruyama T, Iwao Y, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M, Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J Control Release* 2009; 136: 232-239.
29. 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.
30. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42: 419-436.

# リポソームヘモグロビン投与下の心筋灌流

## Application of Liposome-encapsulated Hemoglobin to Myocardial Perfusion

松本 健志  
Takeshi Matsumoto

### 和文抄録

心筋血流は各心筋領域の酸素需要に見合った空間的な不均一性を示し、そのパターン変化は微小心筋障害の発生に深く関与する。本邦で開発の進むリポソーム・ヘモグロビン（LEH）の投与が心筋局所灌流に及ぼす影響について、インビボおよび交叉灌流実験によって評価した。約半分の血液をLEH溶液（LEH体積率、17～18%）と交換すると、左室心筋内の灌流分布不均一性の低下、循環血液の見かけの粘性低下により、冠動脈および頸動脈において70%の血流増加が認められた。一方、血圧、左室発生圧、心拍動数、および血管トーヌスは概ね維持された。さらに、解剖学データに基づく冠動脈分岐モデルを作成し、これにFahraeus-Lindqvist効果、Fahraeus効果、およびphase separation効果を考慮して、LEH灌流下の心筋酸素分配の数値解析を行った。交換輸血に伴う低ヘマトクリット化は赤血球分配の偏向性を強め、赤血球依存性の酸素分配の偏りは増大するが、プラズマ中のLEHがこれを代償し、心筋酸素分配は交換前とほぼ同様であることが示された。

### Abstract

Regional myocardial blood flows match the oxygen demands in the corresponding regions, which are not spatially uniform. Thus, myocardial blood flow distribution is heterogeneous and its alteration will be involved in the occurrence of myocardial microinfarction. The effect of liposome-encapsulated hemoglobin( LEH )transfusion on regional myocardial perfusion was evaluated by in vivo and cross-circulated rat heart experiments. Myocardial flow distribution in the left ventricular free wall measured by tracer digital radiography was lowered when half the amount of blood was replaced with LEH solution( 17 ~ 18 % v/v ) Coronary and carotid flows increased by 70 %, which is likely to be explained by the reduction of apparent flow viscosity. Arterial pressure, left ventricular developed pressure, and heart rate remained unchanged and coronary tone was fairly preserved. In addition, a mathematical model based on the coronary arterial anatomy, including the Fahraeus-Lindqvist, Fahraeus, and phase separation effects, showed that the LEH transfusion may compensate for an enhanced bias in erythrocyte-associated O<sub>2</sub> flux under hemodilution and is expected to be beneficial for maintaining local O<sub>2</sub> deliveries.

### Keywords

liposome-encapsulated hemoglobin, regional myocardial perfusion, spatial heterogeneity, tracer digital radiography, blood rheology, local oxygen delivery, mathematical model

### 1.はじめに

リポソームにヘモグロビンを封入した人工赤血球（LEH）は、血液製剤の持つウィルス感染や免疫反応のリスク減少、さらに献血人口低下に伴う輸血用血液不足の克服を目的に、本邦で開

発が進められている。血液型を問わず輸血が可能であるため、救急輸血にも適し、保存期間も血液より長い。本来の赤血球と類似した酸素結合・解離特性を持つことから、パーカルオロケミカルなどと比較して理想的であるといえる<sup>1,2)</sup>。その第一義的

役割は、大量出血による血圧減少と酸素供給不足を回避するための輸血用代替血液としての役割であり、その効果や安全性も確認されている<sup>4,7)</sup>。一方、LEHの球径は200~300nm程度であり、赤血球では変形しないと通過できないような毛細血管も容易に通過できることから、微小循環改善を目的とした利用価値にも注目が置かれている。実際に脳、心臓などの梗塞部位に対するLEHの保護的、治療的効果が確認されている<sup>8,10)</sup>。

しかし、扁平で変形しやすい赤血球とは大きさもレオロジーも異なるLEHが、臓器内の局所灌流にどの様な影響をもたらすのか不明な点も多い。微小血管分岐において、赤血球は必ずしも血流に比例して分配されるわけではなく、血流の高いほうにより多く分配される傾向がある<sup>11,12)</sup>。血液とLEHが混和した時のヘマトクリットの低下や血流粘性変化、また、血管トーヌスの変動によって血管分岐部の血流分配は変化し、異なる血液/酸素供給分布のパターンが形成される可能性がある。元来、心筋の酸素需要は空間的に一様ではなく、通常、心筋灌流も酸素需要に見合った空間的不均一性を示しているが<sup>13,14)</sup>、LEH投与による局所的な酸素需給バランスの変化は微小心筋障害の一因にもなり得る。心筋内血流分布がLEH投与によってどう変化し、その結果、局所酸素供給がどの様な影響を受けるのか、興味深いところである。

本稿では、著しい血流不均一性を示し、心機能不全発症において微小循環障害が重要視される心筋に注目し、我々が開発した計測手法により明らかにしたLEH投与の局所心筋灌流への影響、さらに、その酸素分配促進効果に対するモデル論的アプローチを紹介する。

## 2. 心筋灌流ラジオグラフィーによる心筋内血流分布計測

血流が赤血球を含む混相流としてその特徴を表すのは、赤血球軸集中に起因するFahraeus効果、Fahraeus-Lindqvist効果、および血管分岐部におけるphase separation効果が顕著に認められる微小循環レベルである（付録参照）。また、心筋血流調節の主座も小動脈血管より小さな直径数百ミクロンに満たない末梢の細動脈血管にあることから<sup>15)</sup>、LEHの局所心筋灌流への影響を評価するには、マイクロスフェア法を凌ぐ非常に高い空間分解能での血流分布計測が必要になる。解剖学的には1本の終端細動脈によって灌流される毛細血管床、機能的には、例えば、NADH蛍光計測で示されるまだら領域（酸素需要 > 酸素供給の領域）が心筋循環単位<sup>16)</sup>と考えられ（図1）、その大きさ数百ミクロンレベルでの局所血流評価が望まれる。我々はトレーサ・デジタルラジオグラフィ<sup>17,18)</sup>を用いて、血液50%を同量の人工血液と置換（交換輸血）したラット心筋スライス内の血流分布イメージをコントロールのそれと比較した（図2）<sup>19)</sup>。ここで、イメージは相対的な分布を256階調で示しており、平均血流はグレー値128に標準化されている。明らかに交換輸血によって不均一性は減少し、局所血流の変動係数（標準偏差/平均）はコントロールの50%に対し、38%であった。使用した人工血液は、テルモ製のLEH（Neo Red Cell）を含む生理食塩水にアルブミン（5g/dl）を加え、NaOH添加でpHを7.4に

調整したもので、LEHの体積率は17~18%，LEHのヘモグロビン含有率は同体積のラット赤血球の2/3程度である。混和後のLEH体積率は8%，ヘマトクリットは23%であった。また、頸動脈血流は70%増加した。混和血液の粘性は血液より40%低下していることから、頸動脈血流の増加はこの粘性低下によるところが大きく、末梢血管抵抗（血管トーヌス）にはほとんど変化の無かったことが示唆される。なお、血圧、心拍数は交換輸血前後で変化はなく、LEHの血管外への漏出は認められなかった。

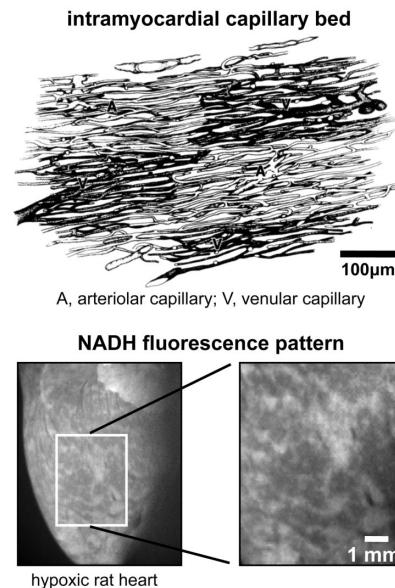


Fig. 1. Anatomical and functional units of myocardial perfusion. Top, arteriolar and venular microvascular beds; bottom, NADH fluorescence pattern appeared on the left ventricular surface under hypoxic perfusion.

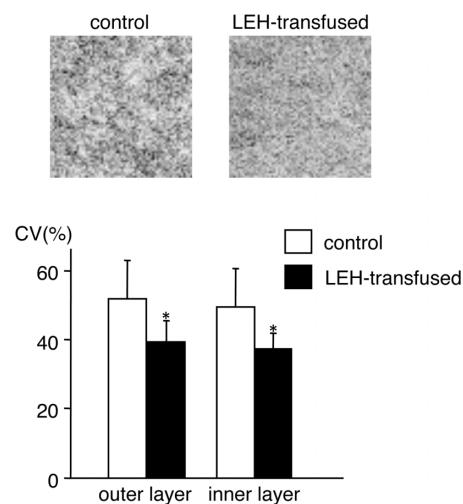


Fig. 2. Top: myocardial flow images of control and NRC-transfused in vivo hearts resolved into  $64 \times 64$  pixels of  $100 \times 100\mu\text{m}^2$ , shaded proportionately with flows normalized by respective means. Bottom: the coefficient of variations of flows (CV( mean  $\pm$  SD)) within outer and inner layers in control and LEH-transfused hearts. \* $p < 0.05$  vs. control.

交換輸血による血流不均一性の低下のメカニズムは明らかではないが、一因としてヘマトクリット低下と流速増加の相効果による赤血球凝集頻度、凝集塊の大きさの低下が考えられる<sup>20,21</sup>。赤血球は低流速、高ヘマトクリットで凝集し易く、赤血球凝集はさらに血流抵抗の増加や一過性の血管閉塞による機能的血管数の減少をもたらして血流低下にはたらき、局所血流の不均一性を増加させる要因となる。交換輸血によって低流量域で赤血球凝集が抑制され、高血流域と低血流域の血管閉塞頻度の差が減少すれば血流不均一性は低下する。さらに、血管内皮上のグライコカリクスも関与している可能性がある<sup>22-24</sup>。グライコカリクス層の厚さは特に低流速域で速度依存性が高いために、流速増加に伴うグライコカリクス層の薄化、すなわち血流抵抗の低下は低流量域においてより顕著となり、やはり血流不均一性の低下に働く。

インビボ実験による検討に加え、交叉灌流モデルの摘出心における冠灌流量および動脈血の酸素飽和度を計測した結果、50%の交換輸血前後の心筋酸素摂取率はともに20%で変化はなく、交換輸血後の血中ヘモグロビン濃度の減少にもかかわらず、灌流量増加によって心筋への酸素供給量は交換輸血前よりも若干増加し、心収縮期圧も数%の増加を示した<sup>25</sup>。図3には、交換輸血前後の冠血流量と30秒間の冠血流遮断後の再灌流時に見られる一過性の冠血流増加（反応性充血）を示す。冠血流量はインビボ実験の頸動脈血流と同程度に増加し、交換輸血後の反応性充血では交換前と同程度の冠血流増加率が見られた。このことは、冠血管トーヌスが交換輸血後もほぼ維持されていることを示唆しており、人工血液存在下の高い血液循環量は低粘性によるもので、メカニカルストレスや代謝依存性の末梢血管の径変化によるものではないことを意味している。

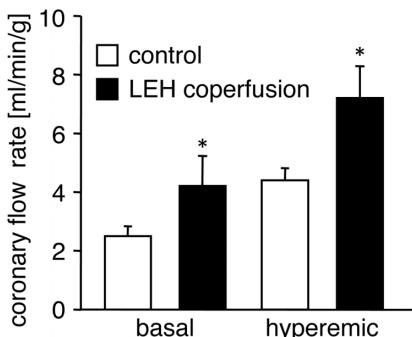


Fig. 3. Coronary perfusion rates (mean  $\pm$  SD) at baseline and at the peak during reactive hyperemia following 30-sec flow interruption before (control) and after LEH coperfusion in cross-circulated hearts. \*p<0.05 vs. control.

### 3. 冠動脈ネットワークモデルによる酸素供給分布解析

図2に示した血流分布の不均一性は赤血球分配、あるいは酸素供給の不均一性とは一致しない。微小血管分岐におけるphase separation（赤血球の偏向分配）やプラズマスキミング（図4）によって、赤血球の運動による酸素供給の不均一性は血流不均一性を上回ると考えられるが、LEHはこれを緩和す

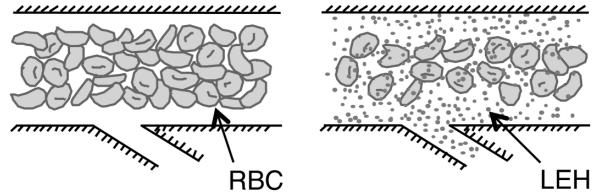


Fig. 4. Facilitated tissue oxygenation by liposome-encapsulated hemoglobin flowing through a small vessel branching off a large parent vessel.

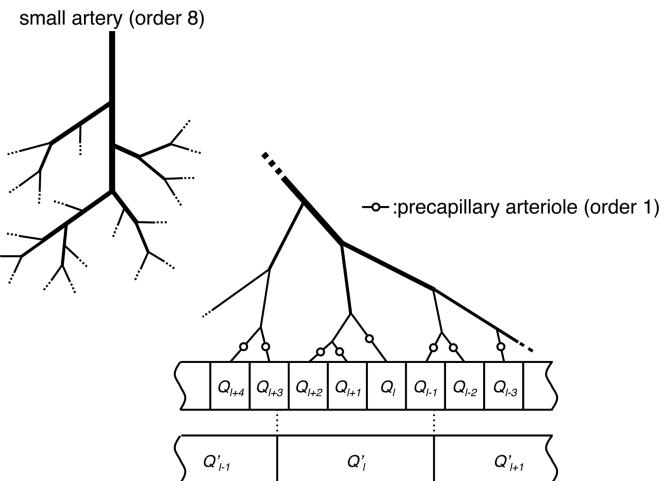


Fig. 5. Coronary arterial tree models originating from the vessel of order 8 down to vessels of order 1, constructed on the basis of anatomical statistics. Regional flows and O<sub>2</sub> fluxes were resampled by aggregating original nearby regions. Branching angles were not addressed in this study.

ることが容易に予想できる。より詳細な検討を行うために、冠血管解剖データに基づく動脈ネットワークモデルを構築し、酸素供給シミュレーションを行った<sup>26</sup>。

使用した冠動脈統計データは、ブタ左前下行枝の抵抗血管に相当する<sup>27</sup>。この統計データに従って、直径400～500μmほどの小動脈（order 8）の入口から分岐部までの長さ、分岐後の2本のdaughter vesselの直径、長さを確率的に決定し、これを毛細血管直前の最小細動脈（order 1）まで繰り返してモデルを作成した（図5）。血流はポアズイユ流れとし、各分岐部で血流の連続性を仮定して全血管内の流れを求めた。但し、各血管*i*における粘性<sub>i</sub>は非ニュートン性（Fahraeus-Lindqvist effect）を考慮し、ヘマトクリットと血管径に依存するとした<sup>28</sup>。

$$i = \text{plasma} \left[ 1 + \left( \frac{0.45}{1 + 10^{-11} D_i^{12}} - 1 \right) \frac{\left( 1 - Hd_i \right)^{C_i} - 1}{\left( 1 - 0.45 \right)^{C_i} - 1} \left( \frac{D_i}{D_i - 1.1} \right)^2 \right] \left( \frac{D_i}{D_i - 1.1} \right)^2 \quad (1)$$

$$C_i = \frac{1}{1 + 10^{-11} D_i^{12}} + \left( -1 + \frac{1}{1 + 10^{-11} D_i^{12}} \right) \left( 0.8 + e^{-0.075 D_i} \right)$$

$$Hd_i = 6e^{-0.085 D_i} + 3.2 - 2.44e^{-0.06 D_i^{0.645}}$$

ここで、<sub>plasma</sub>はプラズマ粘性、*Hd<sub>i</sub>*は流出ヘマトクリット、*D<sub>i</sub>*は血管径（μm）である。

血管分岐部において、parent vessel  $i$  の直径を  $D_i$ 、daughter vessel  $j, k$  の直径を各々  $D_j, D_k$  としたとき、赤血球分配比を Pries らが提案している以下の実験式で決定した<sup>28)</sup>。

$$\text{logit} \left( \frac{E_{ij}}{E_i} \right) = A + B \cdot \text{logit} \left( \frac{(Q_j/Q_i) - X_0}{1 - 2X_0} \right)$$

$$A = 13.29 \left( \frac{D_j^2/D_k^2 - 1}{D_j^2/D_k^2 + 1} \right) \left( \frac{1 - Hd_i}{D_i} \right) \quad (2)$$

$$B = 1 + 6.98(1 - Hd_i)/D_i$$

$$X_0 = 0.694(1 - Hd_i)/D_i$$

ここで、 $Q_i$  は parent vessel  $i$  内の流量、 $Q_j$  は daughter vessel  $j$  内の流量、 $E_i (= Hd_i \cdot Q_i)$  は parent vessel  $i$  からの赤血球流出量、 $E_{ij}$  は daughter vessel  $j$  への赤血球流入量、また、 $\text{logit}(x) = \ln[x/(1-x)]$  である。流出ヘマトクリットとチューブヘマトクリット ( $Ht_i$ ) は以下の実験式 (Fahraeus effect) で関係づけた<sup>28)</sup>。

$$\frac{Ht_i}{Hd_i} = Hd_i + (1 - Hd_i)(1 + 1.7e^{-0.415D_i} - 0.6e^{-0.011D_i}) \quad (3)$$

LEH は血漿中に均一に分布すると仮定して、血管  $i$  による酸素供給量を以下の式で決定した。

$$Oxy_i = C_{\text{Hb}} Q_i [RBC \cdot Hd_i + LEH \cdot Vf_{\text{LEH}}(1 - Hd_i)] \quad (4)$$

ここで、 $C_{\text{Hb}}$  (1.34mL-O<sub>2</sub>/g-Hb) はヘモグロビンの最大酸素運搬量、 $RBC$ 、 $LEH$  は各々、動脈血中の酸素化され赤血球ヘモグロビンおよび LEH のヘモグロビン濃度で、動脈血酸素分圧 100torr では各々、0.174, 0.279g-Hb/mL に設定した。また、 $Vf_{\text{LEH}}$  は血漿中の LEH 体積率である。血漿への酸素溶存は無視している。

入口動脈圧 (order 8) を 100mmHg、出口動脈圧 (order 1) を 30mmHg として、入口動脈内のチューブヘマトクリット  $Ht_{\text{inlet}}=0.4$ 、 $Vf_{\text{LEH}}=0$ 、 $Vf_{\text{plasma}}=1.2$ cP の場合、 $Ht_{\text{inlet}}=0.2$ 、 $Vf_{\text{LEH}}=0.25$ 、 $Vf_{\text{plasma}}=1.4$ cP の場合 (LEH との 50% 置換)、 $Ht_{\text{inlet}}=0.2$ 、 $Vf_{\text{LEH}}=0.0$ 、 $Vf_{\text{plasma}}=1.2$ cP の場合 (血漿増補液 (PVE) との 50% 置換) について計算を行った。なお、平均的な灌流パターンへの影響が小さいと報告されている血圧、心筋の拍動性は考慮していない<sup>29)</sup>。

統計確率的に作成した 5 つの動脈ネットワークモデルにおける平均をみると、LEH 置換では 37 % の全灌流量の上昇に応じて酸素供給量は 11 % 上昇したが、PVE 置換では全灌流量は 60 % 上昇するものの、酸素供給量は 20 % 低下した。一つのモデルに対する局所血流および局所酸素供給量のヒストグラムを図 6 に示す。各局所量は平均値で標準化されている (本モデルで求めた局所血流分布について、LEH、PVE 置換の違いは式 (1) の  $Vf_{\text{plasma}}$  のみであり、標準化された局所血流分布について両者は等しくなる)。ここで局所心筋サイズは図 5 に示すように、全てのモデルで  $2^{11}$  個のサンプル数になるようにリサンプ

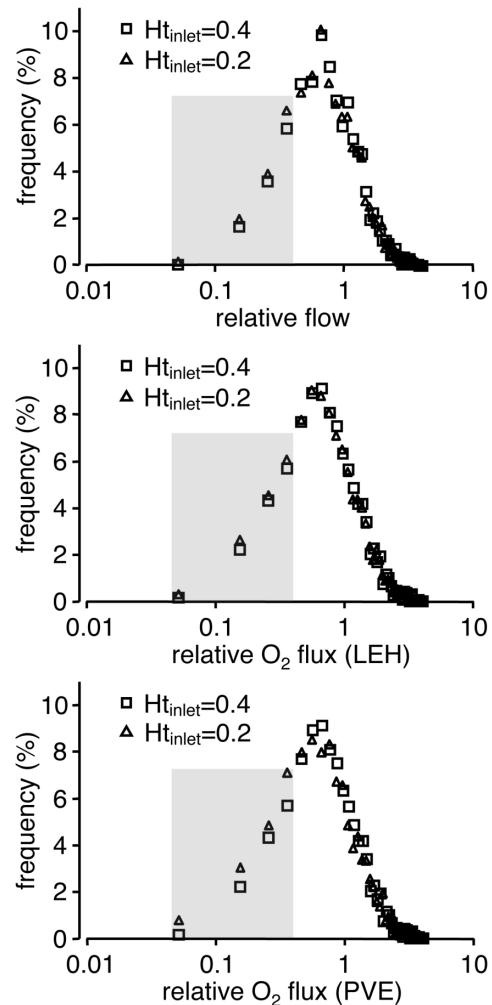


Fig. 6. Effects of 50 % exchange transfusion on the frequency distributions of relative flow (top) and relative O<sub>2</sub> flux with LEH or PVE (middle and bottom, respectively)

リングした (5 つのモデルの order 1 血管の総数 N は  $4011 \pm 187$  (3817-4294) であり、ほぼ 2 本の order 1 血管が一つのサンプルを灌流している ( $N/2 \sim 2^{11}$ ))。局所血流については絶対量は異なるものの、ラットの実験で認められたような交換輸血による血流不均一性の減少は再現できず、置換による影響はほとんど現れなかった。ここでは血球の凝集や血管塞栓、血管内皮グライコカリクスなどの効果は考慮されておらず、これらは血流分配において重要な要素であることが示唆される。

一方、酸素供給分布については、其々の置換は特に低灌流領域において異なる結果を示した。局所酸素供給が 0.4 以下の領域 (グレーで示した部分) に注目すると、LEH 置換ではほとんど変化が見られなかったものの、PVE 置換ではこれら低灌流領域数は増加した。すなわち、PVE 置換では全酸素供給量の低下に加えて、他の領域より相対的に大きく酸素供給が減少する領域が現れ、local hypoxia の発生が予想される。これに対し、LEH 置換は相対的な分布を維持しながらも、絶対的な酸素供給量をも増加させた。さらに詳細にこの違いを検討した結

果を図7に示す。置換前の標準化された局所酸素供給量を5クラスに分け、置換後の各クラスに属する領域数の増加率を5つのモデルの平均で示している。<0.4の低酸素供給の領域数は、PVE置換ではLEH置換に比べて3倍近くの増加率を示し、LEHの酸素運搬体としての効用がこの領域で特に高いことがわかる。平均酸素供給量付近では、LEH置換による領域数の減少は、PVE置換の場合の約半数に抑えられている。

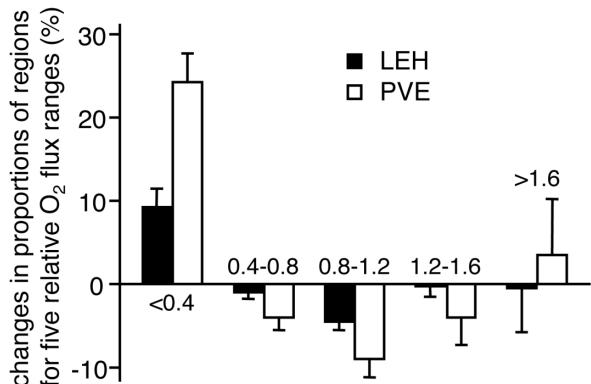


Fig. 7. Percentage( mean  $\pm$  SD ) changes in the proportions of regions due to 50 % exchange transfusion with LEH or PVE. Regions are classified into five divisions according to their relative O<sub>2</sub> fluxes ( <0.4, 0.4-0.8, 0.8-1.2, 1.2-1.6, and >1.6 )

ヘマトクリットの減少は血流粘性低下による灌流量上昇に働く一方で、式(2)に従って血管分岐部における赤血球の偏向分配の傾向を増加させる。赤血球によって運搬される酸素は高血流方向に偏り、PVE置換では酸素供給分布のばらつきの増加に働く。これに対し、LEH置換ではプラズマ中のLEHによって運ばれる酸素が、赤血球の偏向流れによる酸素供給の不均一增大効果を代償する。その代償効果はヘマトクリットが低い循環領域ほど、すなわち、低灌流領域ほど大きい。

#### 4. おわりに

ここでは、LEHの心筋灌流への影響について局所的な血流/酸素分配に着目し、インビオおよび交叉灌流実験による検討、さらに数学モデルによるアプローチを紹介した。これらの結果はNeo Red Cell(テルモ)のデータに基づくものであるが、他のサブ・マイクロカプセル型や非カプセル型の人工赤血球でも同様の結論が得られると思われる。人工赤血球による交換輸血は、血圧・心機能の維持に加え、心筋灌流を一様化し、また、冠血管トース(冠予備能)の維持にも有効であった。ヘマトクリットの低下によって赤血球依存性の酸素供給の偏りは増大するが、プラズマ中の人工赤血球はこれを代償し、正常ヘマトクリット時と同等の局所酸素需給のバランスが保たれ、心機能の維持に寄与している可能性が窺われた。

数学モデルでは考慮しなかった心拍動は、微小血管床の平均的な血流分布に関する限り、その影響は小さいと報告されている。しかし、心筋メカニカルストレスに起因する冠スロッシュ

現象<sup>30)</sup>は、他臓器には見られない冠循環の特徴であり、血液粘性の減少はこれをより強調することが予想される(図8)。今回の実験では確認されなかったものの、この血流の振り戻し効果により、心内膜側から心外膜側への血流シフトが増大すれば、易虚血性の心内膜側には悪影響を与えるかねない<sup>31)</sup>。流れ依存性の赤血球の凝集や離散も含め、これらが血流不均一性や局所酸素供給に与える影響について、血液との交換率、人工赤血球の循環時間を考慮した詳細な検討も今後の課題である。

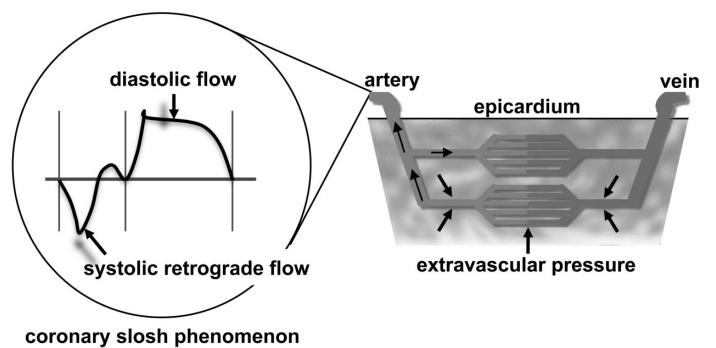


Fig. 8. Coronary slosh phenomenon, produced through cardiac mechanical stress exerted on intramyocardial vessels.

#### 付録：微小循環における赤血球

血管半径方向のずり速度の違いによって、赤血球は流れの速い中心軸方向に移動し、流れの遅い血管壁近傍には赤血球が排除された数ミクロンの血漿層が形成される。その結果、赤血球は血漿に比べて血管内を速く通過し、血管から流出する血液のヘマトクリット(流出ヘマトクリット,  $H_d$ )に比べて血管内のヘマトクリット(チューブヘマトクリット,  $H_t$ )は小さくなる。この現象はFahraeus効果と呼ばれ、直径数百ミクロン以下の小動脈で現れ始め、赤血球と血漿との流速差が最大となる微小細動脈で最も顕著になる。さらに血管径が小さくなると、赤血球の流れは多層流から単層流へと変化するため、赤血球と血漿との流速差は減少し、その効果は弱まる(実験式(3))。また、チューブヘマトクリットの低下によって血液の見かけの粘性は減少するが、これはFahraeus-Lindqvist効果として知られている。一方、血管分岐部では、赤血球の軸集中によって分岐血管に流れ込む血漿層の体積率が低血流側で高くなるphase separationが発生し、その結果、高血流側の分岐血管に比べて低血流側の分岐血管のヘマトクリットが低くなる(赤血球の偏向分配)。この現象は血管分岐部を経るごとに末梢に至るまで繰り返され、血流分配の不均一性を上回る赤血球配分、すなわち酸素供給の不均一分布が形成されることになる。Priesら<sup>28)</sup>によって与えられたFahraeus-Lindqvist効果の実験式(1)から求まる血液粘性のプラズマ粘性に対する相対値( / <sub>plasma</sub>)と血管径の関係、およびphase separation効果の実験式(2)から求まる赤血球分配比と血流分配比の関係を図Aに示す。

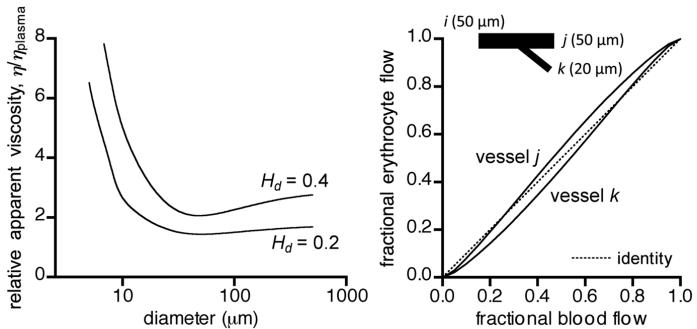


Fig. A. Left: Fåhraeus-Lindqvist effect (equation(1)) Apparent blood viscosity divided by plasma viscosity( relative apparent viscosity ) versus tube diameter is shown. Right: phase separation at a microvascular bifurcation( equation(2) ) The relation between fractional erythrocyte flow and fractional blood flow into the two daughter vessels is shown for  $D_f=D_j=50\mu\text{m}$ ,  $D_k=20\mu\text{m}$ , and  $Hd_i=0.1$ , indicating that the hematocrit in the daughter vessels differs from that in the feeding vessel.

## 参考文献

1. Chang TM. Future generations of red blood cell substitutes. *J Intern Med* 2003; 253: 527-535.
2. Takaori M. Approach to clinical trial considering medical ethics and efficacy for HbV, liposome encapsulated hemoglobin vesicle. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2005; 33: 65-73.
3. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Artif Organs* 2009; 33: 139-145.
4. Rabinovici R, Spirig A, Abdullah F, Phillip DR, Ovadia P, Rudolph A. Liposome-encapsulated hemoglobin does not exacerbate endotoxin-induced lung injury. *Crit Care Med* 2000; 28: 1924-1930.
5. 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-H1199.
6. Goto Y, Terajima K, Tsueshita T, Miyashita M, Horinouchi H, Sakai H, Tsuchida E, Sakamoto A. Fluid resuscitation with hemoglobin-vesicle solution does not increase hypoxia or inflammatory responses in moderate hemorrhagic shock. *Biomed Res* 2006; 27: 283-288.
7. Usuba A, Osuka F, Kimura T, Sato R, Fujita Y, Yamashita M, Hoshino C. Liposome encapsulated hemoglobin as a resuscitation fluid for hemorrhagic shock. *Artif Organs* 1998; 22: 116-122.
8. Isaka M, Imamura M, Sakuma I, Shiiya N, Ishizuka T, Ogata Y, Yasuda K. Experimental study of pegylated liposomal hemoglobin on norepinephrine release and reperfusion arrhythmias in isolated guinea pig hearts. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 13: 391-395.
9. Kawaguchi AT, Kurita D, Furuya H, Yamano M, Ogata Y, Haida M. Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates brain edema after permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Artif Organs* 2009; 33: 153-158.
10. Oda T, Nakajima Y, Kimura T, Ogata Y, Fujise Y. Hemodilution with liposome-encapsulated low-oxygen-affinity hemoglobin facilitates rapid recovery from ischemic acidosis after cerebral ischemia in rats. *J Artif Organs* 2004; 7: 101-106.
11. Fenton BM, Carr RT, Cokelet GR. Nonuniform red cell distribution in 20 to 100 micrometers bifurcations. *Microvasc Res* 1985; 29: 103-126.
12. Pries AR, Ley K, Claassen M, Gaehtgens P. Red cell distribution at microvascular bifurcations. *Microvasc Res* 1989; 38: 81-101.
13. Loncar R, Flesche CW, Deussen A. Coronary reserve of high- and low-flow regions in the dog heart left ventricle. *Circulation* 1998; 98: 262-270.
14. Schwanke U, Deussen A, Heusch G, Schipke JD. Heterogeneity of local myocardial flow and oxidative metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H1029-H1035.
15. Hoffman JI, Spaan JA. Pressure-flow relations in coronary circulation. *Physiol Rev* 1990; 70: 331-390.
16. Matsumoto T, Kajiya F. Microheterogeneity of myocardial blood flow. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 547-552.
17. Matsumoto T, Goto M, Tachibana H, Ogasawara Y, Tsujioka K, Kajiya F. Microheterogeneity of myocardial blood flow in rabbit hearts during normoxic and hypoxic states. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996; 270: H435-H441.
18. Matsumoto T, Tachibana H, Ogasawara Y, Kajiya F. New double-tracer digital radiography for analysis of spatial and temporal myocardial flow heterogeneity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H465-H474.
19. Matsumoto T, Asano T, Mano K, Tachibana H, Todoh M, Tanaka M, Kajiya F. Regional myocardial perfusion under exchange transfusion with liposomal hemoglobin: in vivo and in vitro studies using rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1909-H1914.
20. Mcchedlishvili G, Gobejishvili L, Beritashvili N. Effect of intensified red blood cell aggregability on arterial pressure and mesenteric microcirculation. *Microvasc Res* 1993; 45: 233-242.
21. Vicaut E, Hou X, Decuyper L, Taccoen A, Duvelleroy M. Red blood cell aggregation and microcirculation in rat cremaster muscle. *Int J Microcirc Clin Exp* 1994; 14: 14-21.
22. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Elevated capillary tube hematocrit reflects degradation of endothelial cell

- glycocalyx by oxidized LDL. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1051-H1057.
23. Desjardins C, Duling BR. Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1990; 258: H647-H654.
  24. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997; 273: H2272-H2279.
  25. Asano T, Matsumoto T, Tachibana H, Takemoto M, Kajiya F. Myocardial microvascular perfusion after transfusion of liposome-encapsulated hemoglobin evaluated in cross-circulated rat hearts using tracer digital radiography. *J Artif Organs* 2004; 7: 145-148.
  26. Matsumoto T, Mano K, Ueha R, Naito H, Tanaka M. Model analysis of local oxygen delivery with liposome-encapsulated hemoglobin. *Med Eng Phys* 2009; 31: 173-181.
  27. Kassab GS, Rider CA, Tang NJ, Fung YC. Morphometry of pig coronary arterial trees. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1993; 265: H350-H365.
  28. Pries AR, Secomb TW. Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H2657-H2664.
  29. Huo Y, Kassab GS. Pulsatile blood flow in the entire coronary arterial tree: theory and experiment. *Am J Physiol* 2006; 291: H1074-87.
  30. Kimura A, Hiramatsu O, Yamamoto T, Ogasawara Y, Yada T, Goto M, Tsujioka K, Kajiya F. Effect of coronary stenosis on phasic pattern of septal artery in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1992; 262: H1690-H1698.
  31. Flynn AE, Coggins DL, Goto M, Aldea GS, Austin RE, Doucette JW, Husseini W, Hoffman JI. Does systolic subepicardial perfusion come from retrograde subendocardial flow? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1992; 262: H1759-H1769.

## 事務局たより

### 日本血液代替物学会 総会

1. 日 時：  
平成21年10月17日（土） 13：40～14：00

2. 場 所：  
慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂  
〒108-8582 東京都新宿区信濃町35

3. 議 題：  
報告事項 第16回年次大会の報告  
会員動向  
委員会報告  
平成20年度事業報告  
平成20年度収支決算  
平成21年度事業（実績報告）  
その他

以下審議内容を略記します。

#### 報告事項

年次大会の開催状況として下記事項が報告された。

- 1) 第16回日本血液代替物学会年次大会
- 2) 平成21年10月16日（金）・17日（土）
- 3) 東京都新宿区信濃町35慶應義塾大学信濃町キャンパス北里講堂
- 4) 日本血液代替物学会会員、  
臨床医学・理工学研究者、  
国内の大学および医療機関臨床医、  
血液センター関係者の参加があった。

会員状況は以下のとおり。

- 1) 維持会員：4社
- 2) 賛助会員：2社
- 3) 正会員：142名
- 4) 購読会員：19箇所

各種委員会からの報告は以下のとおり。

#### \* 編集委員会

会誌「人工血液」の発行。

- ・平成20年度：第15巻3-4号、第16巻1号、2号、3号、4号発行。
- ・平成21年度：第17巻1号、2号、3号発行。第17巻4号発行予定。

#### \* ホームページ委員会

学会ホームページURL：<http://www.blood-sub.jp/>

平成20年度事業報告(平成20年4月1日～平成21年3月31日)  
が行われ各々承認された。

#### 1) 定期総会の開催

平成20年10月23日（木） 慶應義塾大学信濃町キャンパス北里講堂にて開催。

#### 2) 第15回年次大会（大会長 堀之内 宏久）

平成20年10月23日（木）

慶應義塾大学信濃町キャンパス北里講堂にて行われた。

#### 3) 「人工血液をつくる（9）」後援

平成20年度収支決算報告が行われ承認された。

平成20年度 会計 収支決算表  
(自 平成20年4月1日 至 平成21年3月31日)

収 入		支 出	
摘要	金額	摘要	金額
前期繰越金	12,648,432	会誌出版費	4,495,892
正会員会費	510,000	集会・委員会費	629,490
入会金	15,000	年会補助金	2,000,000
賛助会員会費	8,000,000	ホームページ維持費	485,520
維持会員会費	200,000	事務人件費	3,000,525
購読会員会費	54,000	事務費	335,451
雑収入	263,490	人工血液をつくる開催費助成	307,866
利息	47,212	基金に繰り入れ	2,500,000
計	21,738,134	次期繰越金	7,983,390
		計	21,738,134

#### 平成21年度事業（実績報告）

#### 1) 定期総会の開催

平成21年10月17日（土）於 慶應義塾大学信濃町キャンパス北里講堂

#### 2) 第16回年次大会の開催（大会長 高折 益彦）

平成21年10月16日（金）・17日（土）

於 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂

#### 3) 「人工血液」の発行

現行役員は下記の通り。

## 事務局たより

### 日本血液代替物学会 役員名簿

顧 問	尾形利郎	東海大学医学部 名誉教授	土田英俊	早稲田大学理工学術院 名誉教授
	高久史麿	自治医科大学 学長	西 勝英	肥後医育振興会 理事
	堀 原一	筑波大学 名誉教授	半田 誠	慶應義塾大学医学部 教授
	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長	平澤博之	千葉大学 名誉教授
会 長	小林紘一	慶應義塾大学 名誉教授	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授
副会長	池田康夫	早稲田大学理工学術院 教授	米川元樹	特定医療法人北榆会 理事長
理 事	東 寛	北海道赤十字血液センター 研究部長	監 事	清水 勝 西城病院 理事
	小田切優樹	崇城大学薬学部 教授		阿岸鉄三 ふれあい町田ホスピタル 血液净化センター センター長
	酒井宏水	早稲田大学理工学術院 准教授	(事務局) 堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授
	末松 誠	慶應義塾大学医学部 医学部長	(会誌担当) 酒井宏水	早稲田大学理工学術院 客員准教授
	高折益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長	(HP担当) 藤島清太郎	慶應義塾大学医学部 講師
	武岡真司	早稲田大学理工学術院 教授		

### 日本血液代替物学会 評議員名簿

青木 克憲	浜松医科大学 教授	高折 益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長
阿岸 鉄三	ふれあい町田ホスピタル 血液净化センター センター長	高久 史麿	自治医科大学 学長
浅野 茂隆	早稲田大学理工学術院 教授	高橋 晃	テルモ(株) 代表取締役社長
東 寛	北海道赤十字血液センター 研究部長	高橋 英嗣	山形大学医学部 准教授
阿部喜代司	筑波大学 名誉教授	高橋 恒夫	東京大学医科学研究所 客員教授
池田 久實	北海道赤十字血液センター 所長	武岡 真司	早稲田大学理工学術院 教授
池田 康夫	早稲田大学理工学術院 教授	田所 憲治	日本赤十字社血液事業本部
池淵 研二	埼玉医科大学 教授	土田 英俊	早稲田大学理工学術院 名誉教授
石原 弘規	弘前大学医学部 准教授	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長
伊藤 俊之	京都赤十字血液センター	友田 煉夫	東京医科大学 教授
稻田 英一	順天堂大学医学部 教授	豊田 忠之	東部地域病院 元院長
大塚 節子	岐阜大学医学部 講師	仲井 邦彦	東北大大学院医学研究科 准教授
大柳 治正	近畿大学医学部 教授	中井 一士	血液製剤調査機構 元理事
尾形 利郎	東海大学医学部 名誉教授	長澤 俊郎	筑波大学臨床医学系 教授
小田切優樹	崇城大学薬学部 教授	中島 常隆	(株)ベネシス 経営戦略部 担当部長
片岡 一則	東京大学大学院工学系研究科 教授	西 勝英	肥後医育振興会 理事
川村 明夫	特定医療法人北榆会 会長	西出 宏之	早稲田大学理工学術院 教授
木下 学	防衛医科大学校 准教授	西谷 孝子	ナノキャリア株式会社
黒澤 良和	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	半田 誠	慶應義塾大学医学部 教授
小林 紘一	慶應義塾大学 名誉教授	平澤 博之	千葉大学 名誉教授
小室 勝利		福島 昭二	神戸学院大学薬学部製剤学 准教授
斎藤 英彦	名古屋セントラル病院 院長	藤井 寿一	東京女子医科大学 教授
酒井 清孝	早稲田大学理工学術院 教授	藤島 清太郎	慶應義塾大学医学部 講師
酒井 宏水	早稲田大学理工学術院 客員准教授	船津 昭信	(財)化学及血清療法研究所 理事長
佐久間一郎	カレスサッポロ北光記念クリニック 所長	外 須美夫	九州大学大学院医学研究院 教授
佐藤 誠	ニプロファーマ(株) 社長	堀 進悟	慶應義塾大学医学部 准教授
鮫島 達也	青山学院大学理工学部 名誉教授	堀 原一	筑波大学 名誉教授
清水 勝	西城病院 理事	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授
清水 慶彦		宮尾 秀樹	埼玉医科大学総合医療センター 教授
十字 猛夫	日本赤十字血液事業本部 中央血液研究所 前所長	村田 満	慶應義塾大学医学部 教授
未松 誠	慶應義塾大学医学部 医学部長	湯浅 晋治	順天堂大学 名誉教授
平 明	鹿児島大学医学部 名誉教授	四津 良平	慶應義塾大学医学部 教授
		米川 元樹	特定医療法人北榆会 理事長

(ア順敬称略)

# 日本血液代替物学会 会則

## 第1章 総 則

第1条：(名称) 本会は日本血液代替物学会 (The Society of Blood Substitutes, Japan) と称する。

第2条：(事務局) 本会の事務局は当分の間、会長の所属機関内に置く。

2. 事務局には事務局長を置き、会長の統括のもと本会の事業および会計に関する一般事務を司る。

第3条：(目的) 本会は、血液代替物およびその関連分野の研究の進歩ならびに普及を計り、会員の研究発表、知識の交換、連絡提携の場となり、血液代替物の評価や今後の指針を提言する活動を通して、学際、国際間に広く貢献することを目的とする。

第4条：(事業) 本会は前条の目的達成のため、次の事業を行う。

- 1) 総会、年次大会(一般演題も含める)、研究講演会、シンポジウムなど。
- 2) 会誌“人工血液”的刊行。
- 3) その他本会の目的に沿った事業。

## 第2章 会 員

第5条：(種別) 本会会員は次の分類とする。

- 1) 正会員 本会の目的に賛同する個人で所定の手続きを行い、会費を納入した者とする。
- 2) 賛助会員 本会の目的を賛助する団体または個人とする。
- 3) 維持会員 本会の目的を賛助する団体または個人であり、本会の維持に格段の協力をする会員をいう。

第6条：(会費) 会員は、つきの種別に従って会費を納めなければならない。

- 1) 正会員 年額 1万円
- 2) 講読会員 年額 6千円
- 3) 学生会員 年額 5千円
- 4) 賛助会員 年額 1口以上 (1口20万円)
- 5) 維持会員 年額 10口以上 (1口20万円)

2. 既納の会費はいかなる理由があっても、これを返還しない。

第7条：(入会) 本会に入会希望者は、正会員1名の紹介により、所定の入会申込書に入会金5千円と一年分の会費を添え事務局宛に提出し、理事会の承認を経なければならない。

第8条：(退会) 退会しようとする会員は、理由とその旨を届け出て、理事会の承認を経なければならない。

第9条：(除名) 本会の目的に反する行為あるいは本会の名誉を損なう行為のあった会員は、評議員会の議決によってこれを除名することができる。

## 第3章 役員、顧問、評議員および職員

第10条：(設置および定数) 本会に次の役員を置く。

- 1) 会長 1名
- 2) 副会長 1名以上5名以内
- 3) 理事 7名以上15名以内(会長、副会長を含む)
- 4) 監事 2名
- 5) 顧問 若干名

第11条：(役員の選任) 役員は、別に定めるところにより、正会員の内から評議員会で選出し、監事は正会員の中から総会で選出する。

2. 顧問は、会長が委嘱し、その任期は役員の任期に準ずる。

第12条：(任期) 役員および監事の任期は2年とし、再任を妨げない。

第13条：(会長) 会長は、各事業を司り本会を代表統括する。

第14条：(副会長) 会長を補佐し会長に事故があるときはその代理となる。

第15条：(理事) 理事は理事会を組織して、この会則に定められた事項のほか、評議員会および総会の権限に属する事項以外の事項を評議し、施行する。

第16条：(監事) 監事は、資産の状況および理事の会務執行状況を監査する。

第17条：(顧問) 顧問は、理事会および評議員会に出席して、意見を述べることができる。

第18条：(評議員) 評議員は正会員の中から総会で選出し、任期は2年とする。ただし再任を妨げない。

2. 評議員は、評議員会を組織し、この会則に定められた事項を決議するほか、会長を補佐して本会の運営を助ける。

第19条：(事務局および職員) 本会の事務を処理するため、事務局および職員を置く。

2. 職員人事は会長が任命権者となり、有給とする。

#### 第4章 年次大会長

第20条：（大会長と職務）本会に年次大会を主宰する大会長1名をおく。また、大会長を補佐し、大会長に事故があったとき、または欠けたときには、その職務を代行する副大会長1名をおくことができる。

第21条：（選任）大会長および副大会長は、評議員の中から、理事会の議決によって選任される。

2. 理事会の議決によって、副大会長を次年度の大会長とすることができます。

第22条：（任期）大会長および副大会長の任期は、選任された日に始まり、学会年次大会が終了した日に終わる。

#### 第5章 会議

第23条：（会議）本会の会議は、つぎの3種とする。

- 1) 理事会
- 2) 総会
- 3) 評議員会

第24条：（理事会）理事会は、理事をもって構成する。

2. 理事会は年4回以上会長が召集する。ただし、会長が必要と認めたとき、または、理事の3分の1が会議の目的および事項を示して請求したときは、臨時理事会を召集することができる。
3. 理事会の議長は会長とする。
4. 理事会は、理事会構成現在数の3分の2以上が出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について文書によってあらかじめ意志を表示した者は、これを出席者とみなす。
5. 監事は、理事会に出席して、本会の運営について意見を述べることができる。

第25条：（総会）総会は、通常総会、臨時総会の2種とし、会長が召集する。

2. 総会は、正会員をもって構成する。
3. 通常総会は、年一回開く。
4. 臨時総会は、次の場合に召集する。
  - 1) 理事会で必要と認めた場合
  - 2) 監事、または会員50名以上から会議の目的を示して請求があった場合

第26条：（総会議長）通常総会の議長は会長とし、臨時総会の議長は、会議の都度会員の互選で定める。

第27条：（総会の通知）総会の召集は、その開会期日1週間前までに、総会に付すべき事項、日時および場所を記録した書面または会誌で、会員に通知しなければならない。

2. 出席会員の3分の2以上の同意があったときは、あら

かじめ通知しなかった事項について審議し、議決することができる。

第28条：（審議事項）次の事項は、通常総会の承認を求めなければならない。

- 1) 事業報告および会員の異動状況書
- 2) 収支決算、財産目録、貸借対照表
- 3) 事業計画および収支予算
- 4) 前記各項のほか、理事会で必要と認めた事項

第29条：（総会の定足数）総会は、正会員現在数の5分の1以上出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 総会に出席できない正会員は、出席正会員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 総会の議決は、出席会員の過半数をもって決し、可否同数のときは議長の決するところによる。

第30条：（総会議事録の通知）総会の議事の要領および議決した事項は、正会員に通知する。

第31条：（評議員会）評議員会は、評議員で組織し、必要がある場合に会長が召集する。

2. 会長は評議員会の議長となる。

第32条：（審議事項）評議員会は、この会則に定めるものほか、理事会で必要と認めた事項を審議する。

第33条：（評議員会の定足数）評議員会は、評議員現在数の2分の1以上の出席がなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 評議員会の議事は、出席評議員の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。評議員会に出席できない評議員は、出席評議員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 会長は、書面で評議員の意見を求める、評議員会の召集および前項の議決にかえることができる。

第34条：（議事録の保存）全ての会議には議事録を作成し、議長および出席者代表者2名以上が署名押印のうえ、これを保存する。

#### 第6章 資産及び会計

第35条：（資産）本会の資産は次の通りとする。

- 1) 会費
- 2) 寄付金
- 3) 事業にともなう収入

- 4) 資産から生じる果実
- 5) その他の収入

第36条：（資産の管理）本会の資産は、会長が管理し、現金は理事会の議決によって、確実な有価証券を購入するか、または定額郵便貯金とするか、もしくは確実な信託銀行に信託するか、あるいは定額預金として会長が保管する。

第37条：（寄付の受領）寄付金品は、理事会の議決を経てこれを受領する。

第38条：（経費）本会の経費は、会費、刊行物に対する購読料、寄付金、資産から生じる果実などの運用資産をもって支弁する。

第39条：（事業計画および収支予算）本会の事業計画およびこれにともなう収支予算は、毎年会計年度開始前に会長が編成し、理事会、評議員会の議決を経て、総会の承認を受けなければならない。

第40条：（収支決算）会計報告は会長が毎年一回、会計報告書を作成し、監事の監査を経て、評議員会および総会の承認を得る。

第41条：（会計年度）本会の会計年度は4月1日より翌年3月31日までとする。

## 第7章 会則の変更ならびに解散

第42条：（会則の変更）本会の会則の変更には理事会の発議と総会の議決を要する。

第43条：（解散）本会の解散は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の同意を得なければならない。

第44条：本会の解散にともなう残余財産は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の議決を経て、本会の目的と同種または類似の公益事業に寄付するものとする。

## 第8章 補 則

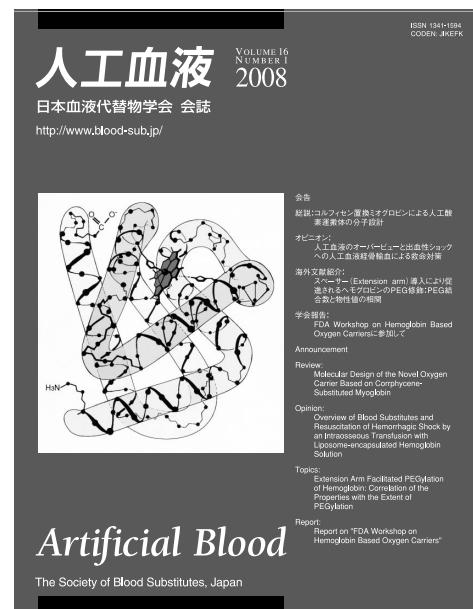
第45条：この会則を施行するために必要とされる細則は、理事会および評議員会の議決を経て、別に定める。

付 則 この会則は、平成5年7月21日設立総会において議決され、当日から施行する。

# Call for Papers

*Artificial Blood*, the official bilingual journal of The Society of Blood Substitutes, Japan, welcomes papers and other articles contributing to the research and development of blood substitutes.

If you wish to submit an article for publication, please email it to the following address after first confirming the instructions for authors.



## Instructions for Authors( last revised Sept. 30, 2008 )

The Journal's purpose is to publish research and related articles contributing to the development of blood substitutes, information on Society proceedings, regulations, and other matters of interest to the Society members, and it welcomes original articles from a range of contributors regardless of format. Although contributors should ideally be members of the Society, this is not a requirement. Decisions on acceptance of manuscripts are made by the Editorial Board based on the results of peer review. Original articles will not be accepted if they have been previously published or are being considered for publication in another journal.

If an article is coauthored, the consent of all coauthors is required before submission. As copyright to articles must be transferred to the Society, the representative of the author(s) must sign and seal a copy of the Copyright Transfer Agreement found in the Journal or downloadable from the Society's website (<http://www.blood-sub.jp/home/index.html>) and submit it to the Editorial Board by post, fax, or by email as a PDF file attachment.

Manuscripts should, as a rule, be prepared by word-processor. However, handwritten manuscripts may be accepted.

1) Articles should be categorized into one of the followings: original articles, review articles, conference reports, topical pieces, and opinion pieces. The category into which a manuscript falls should be clearly indicated at the top right-hand corner of the first page. Manuscripts that do not fall into any of these categories may also be accepted, and manuscripts may also be re-categorized depending on the opinion of the

reviewers. Submit your manuscripts to the Editor-in-Chief by either of the following methods with a covering letter( of any format )

i ) Submission by email of electronic files of the text and figures ( indicate the software used ) Text and tables should be in DOC or TXT formats, and figures should be in PPT, JPG, or TIFF formats.

ii ) Submission by post of four sets of hardcopies.

2 ) Manuscripts are reviewed by researchers in the field of artificial blood selected by the Editor-in-Chief, and revisions may be required depending on the opinion of the reviewers. Revised manuscripts should be submitted with a "Response to Reviewers" to the covering letter that responds to each of the points made by the reviewers, indicating any revisions made to the manuscript.

3 ) Once informed of the decision to accept for publication, the author should send by post files containing the text and figures of the accepted paper saved in electronic media to the address specified( indicate the software used ) Text and tables should be in DOC or TXT format, and figures should be in PPT, JPG, or TIFF format.

4 ) Manuscripts should be typed on A4 or letter size paper. The title page should include the title, names of authors, institutions to which all the authors belong, and the address of the corresponding author. Handwritten manuscript should be written consisting of 20 lines to 1 page.

5) Original articles, review articles, topical pieces, and opinion pieces should include an abstract and about 6 keywords on the second or subsequent pages.

6) Research conducted with the aid of an official grant must be acknowledged, and any conflict of interests( for example, if the author has an interest in a company distributing the drug described in the manuscript: being an employee or consultant to that company, receiving research funding, owning shares or patents, and so on )must be described in a footnote on the first page or in acknowledgment section.

7) If a manuscript describes the results of research on humans or animals, it should be indicated that such research was performed in accordance with the guidelines of the institute concerned in the methods or other appropriate sections of the manuscript.

8) Abbreviations should be spelled out on their first appearance. The names of drugs, medical drugs, laboratory equipment, and so on should be given. The type, distributor( manufacturer )and the address should also be indicated.

Example: Rhodamine B( Sigma-Aldrich, St. Louis, USA )  
Polygraph system( LEG-1000; Nihon Kohden Corporation, Tokyo )

9) The English fonts should be Times, Helvetica, Courier, or Symbol. Text should be typed in lower-case one byte characters. However, sentences and proper nouns should begin with an upper-case letter.

10) Figures should be expressed in Arabic numerals. Weights and measurements should be expressed in units such as the followings: m, cm, mm,  $\mu$ m, L, mL,  $\mu$ L, mol, g, mg,  $\mu$ g, ng, pg, fg, N/10.

11) Figures and tables should be numbered in order of citation, and it should be clearly indicated where they are to appear in the main text. The title, legends and description in tables and figures should be written in English. Figures will be printed by direct offset printing. Tables will be inputted by the Editorials as originals.

12) References should be cited numerically in order of appearance in the text using superscript letters as follows: <sup>2)</sup>, <sup>35)</sup>, <sup>1, 46)</sup>, etc. References should be listed using the Vancouver style as follows: Names of all authors. Title of paper. Title of journal. Year of publication; volume number: inclusive page numbers.

Abbreviations of journal names should be in accordance with *Index Medicus*. References to books should be given as follows:

Names of all authors. Title of paper. Name of editor( s ) Book title. Place of publication: Publisher, year; inclusive page numbers.

References to electronic sources should be given as follows:

Name of website.

Address on new line( month and year of last access )

Examples:

1. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; 35: 481-489.
2. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2008; 299: 2304-2312.
3. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances of Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. *Blood Substitutes*. London: Academic Press( Elsevier ) 2006; 514-522.
4. Oxygen Infusion Project, Waseda University, Japan.  
<http://www.waseda.jp/prj-artifblood/index-j.html>( last accessed Sept 2008 )

13) In the case of citation or reproduction of previously published figures or tables and other content, the permission of the copyright holder( s )must first be obtained. Copyright in the published papers shall belong to the Society.

14) Regarding secondary use and copyright in works published in the Journal, secondary use may be made of the Journal, in whole or in part, via media such as CD-ROM or the Internet. Reproduction rights, translation rights, film rights, dominion, and public transmission rights( including the right to make the works transmittable )are transferred to the Society by the author's submission of the aforementioned Copyright Transfer Agreement. This clause shall not restrict reuse by the author himself/herself, but the Editor-in-Chief must be informed in the event of reuse.

15) No publication fee is charged for publication in the Journal, and the author( s )shall receive as a gift 30 offprints of their contributions. Authors will be charged for copies in excess of this number( approximately 100 yen per copy ) Authors wanting prints of color photos or on art paper, etc. must pay the actual cost of such prints.

16) Address for manuscripts to be sent:

Attn: Artificial Blood Editorial Office  
The Society of Blood Substitutes, Japan  
Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery,  
Keio University, School of Medicine  
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan  
Tel: +81-3-5363-3493 Fax: +81-3-5363-3499  
E-mail : amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

## 投稿規定（平成20年9月30日改訂）

本誌は、血液を構成するあらゆる成分について、その代替物を開発する研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広く集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は、査読結果に従って編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

共著者がいる場合には、共著者全員の承諾を得てから投稿する。論文の版権は本学会に譲渡しなければならない。このため、著者の代表者は、本誌に添付の著作権譲渡同意書（Copyright Transfer Agreement）或は、本会のホームページサイト（<http://www.blood-sub.jp/home/index.html>）からダウンロードしたものに署名捺印の上、郵送、Fax、またはpdfファイルとしてE-mailにて編集委員会宛に提出する。

ワープロを用いて作製した原稿の投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

1) 原稿の種類は、「原著論文」、「総説」、「学会報告」、「トピックス」、「オピニオン」、「海外文献紹介」から選び、これを第1頁の右肩上に明記すること。これらに該当しない原稿も受け付ける。査読意見によっては種類が変更される場合がある。次のいずれかの方法により、送付状（任意のフォーマット）を添えて編集委員長宛に投稿する。

i) 文章と図表の電子ファイルをEメールで送付する（使用したソフトを明記すること）。文章・表のファイル形式は、doc, txtが好ましい。図は、ppt, jpg, tiffが好ましい。

ii) ハードコピー4部を郵送する。

2) 投稿論文の査読は、編集委員長が選んだ人工血液分野の研究者に依頼する。査読意見によっては、原稿の修正を求める場合がある。修正論文（Revised Manuscript）の投稿に際しては、送付状に「査読意見に対する回答」を添え、意見に対して一つ一つ回答をするとともに、修正箇所がある場合にはこれを明記する。

3) 掲載決定通知の後、著者は採択論文の文章・図表のファイルを電子媒体として、指定する宛先に送付すること（使用したソフトを明記すること）。文章・表のファイル形式は、doc, txtが好ましい。図は、ppt, jpg, tiffが好ましい。

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

者名、全著者所属、英文著者名、英文著者所属、続いて連絡の取れる著者（corresponding author）の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。

5) 「原著論文」、「総説」、「トピックス」、「オピニオン」については、第2頁以降に和文抄録、Keywords（英文で6個程度）を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。

6) 投稿論文に記載の研究が公的助成を受けて実施された場合には、謝辞にその旨を記載すること。また、Conflict of Interests（例えば、論文に記載された薬品を販売する企業と著者との利害関係：雇用、コンサルタント、研究助成、株式、特許など）があれば、これを第1頁の脚注、謝辞などに記載すること。

7) ヒトを対象とした研究結果、および動物実験の結果を掲載する場合には、各研究機関のガイドラインに従って実施したことなどを明記すること。

8) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。薬品、医薬品、測定装置等は、外国語名の場合は言語のまま用い、日本語化しているものはカタカナとする。型式、販売（製造）元とその所在地も記入すること。

（例）Rhodamine B（Sigma-Aldrich, St. Louis, USA）ポリグラフシステム（LEG-1000；日本光電工業、東京）

9) 句読点はコンマ（，）ピリオド（。）とする。

10) 文中の英語に使用するフォントは、Times, Helvetica, Courier, Symbolを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。

11) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μm, L, mL, μL, mol, g, mg, μg, ng, pg, fg, N / 10などを用いる。

12) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は、全て英文とすることが好ましい。本文中に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。

13) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では<sup>2)</sup>, <sup>3,5)</sup>, <sup>1,4,6)</sup>などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名。論文題名。誌名 西暦発行年；巻数：頁～頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicusに準拠する。単行本の場合は全著者名。題名。編集者名。書名。発行地：発行書店、年号；頁～頁。の順とする。電子文献の場合は、ホームページ名。改行してアドレス（引用した西暦年月）とする。

(例)

1. 高折益彦. 人工酸素運搬体:その将来への期待. 人工血液 2007;15:90-98.
2. 橋本正晴. 単回投与毒性試験. 野村 譲, 堀井郁夫, 吉田武美編. 非臨床試験マニュアル. 東京: エルアイシー, 2001;37-48.
3. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2007; 35: 481-489.
4. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. J Am Med Assoc 2008; 299: 2304-2312.
4. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances of Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. Blood Substitutes. London: Academic Press (Elsevier) 2006; 514-522.
5. 早稲田大学酸素輸液プロジェクト.  
<http://www.waseda.jp/prj-artifblood/index-ja.html>  
(2008年9月現在)

14) 既発表の図表, その他を引用, 転載する場合には, あらかじめ版権所有者の許可を得ること. また, 掲載論文の著作権は本学会に帰属する.

15) 二次掲載について. 本誌は, 他の言語すでに掲載された論文を和文で二次掲載することは二重投稿ではなく正当な掲載と認めるが, 著者は以下の事項を遵守する.

- a ) すでに掲載された論文であること.
- b ) 著者は両方の雑誌の編集者より許可を得ていること. 二

次掲載する編集者に最初に掲載されたもののコピー, 別刷, もしくは原稿のいずれかを添付すること.

- c ) 論旨を変えないこと. 執筆者は同一(順不同)であること.
- d ) 二次掲載版のタイトル・ページに掲載される脚注には, その論文の全体もしくは一部分がすでに掲載されている旨を明記し, 更に初出文献も示すこと. 適切な脚注の例を以下に示す. 「This article is based on a study first reported in the [...]雑誌タイトル(完全な典拠情報を添えたもの) [...]」(訳: この論文記事は, [...]に最初に報告された研究に基づくものである).

これらの要件を満たしている場合は, その旨を明記して, 総説または論文記事(二次掲載)として投稿する.

16) 本誌掲載著作物の二次利用および著作権について. 本誌の一部, もしくは全部をCD-ROM, インターネットなどのメディアに二次利用する場合がある. 本誌に掲載する著作物の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は, 著者が上述の著作権譲渡同意書を提出することにより, 本学会に譲渡される. 本項は, 著作者自身の再利用を拘束するものでは無いが, 再利用する場合は, 編集委員長に通知すること.

17) 掲載料. 掲載料は無料とし, 論説, 総説, 原著, 報告等について別刷り30部を贈呈する. それを越える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円). カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は, 著者の実費負担とする.

18) 原稿の送付先

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35  
慶應義塾大学医学部呼吸器外科内  
日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部 宛  
電話: 03 - 5363 - 3493, FAX: 03 - 5363 - 3499  
E-mail: amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

## 編集後記

2008年秋に慶大で開催された国際会議Current Issues on Blood Substitutes Researchに招聘したBrown UniversityのDr. Kimが総説を寄稿してくださった。非細胞型のHBOCsは血管収縮-血圧亢進を起こす事が問題であるが、これを血圧降下剤や血管拡張剤などの薬剤の併用で改善させようとするものである。非細胞型のHBOCsについてはFDAが否定的な見解を示していることは本誌でも2008年16(1)号に紹介しているが、果して薬剤の併用で問題が解決されるのか、今後の展開が注目される。同志社大の北岸先生・加納先生からは、完全合成系の人工酸素運搬体について、ご報告頂いた。早稲田大学の土田先生のグループが行ったポルフィリン誘導体とはまた異なる、シクロデキストリンで中心鉄を保護する形式である。今後の動物実験でどのような結果が出るか、特に代謝性や半減期の結果についてはとても楽しみである。熊本大の田口先生からは、ヘモグロ

ビン小胞体の体内動態についておまとめ頂いた。周知の如クリポソーム製剤として既に抗癌剤や抗菌剤を含有した製剤が認可されているが、いずれも投与量は少ない。対して人工血液としてのヘモグロビン小胞体は大量投与を前提としている。大量投与をした際の体内動態を詳細に検討し、安全性に関する詳細な知見を得ている。最後に、阪大の松本先生は、同じく細胞型人工酸素運搬体(LEH)の微小循環系における流動特性と、その心筋虚血に対する効果についてトピックスとして御寄稿頂いた。なぜ虚血性疾患に対し粒径の小さい人工血液が有効であるか、シミュレーションを駆使して見事に明らかにしている。

編集委員会からの突然の寄稿依頼に対し、ご快諾を頂き、著者の先生方に心より御礼申し上げます。

(酒井 宏水)

---

**編集委員会**

酒井 宏水(委員長), 東 寛, 大谷 渡, 武岡 真司, 堀之内 宏久, 村田 満, 渡辺 真純

---

**日本血液代替物学会 会誌**

発行 日本血液代替物学会

**編集・制作「人工血液」編集委員会**

**印刷 株式会社 研恒社**

**人工血液 vol.17(4) 2010年2月28日発行**

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL(03)5363-3493 FAX(03)5363-3499

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 55号館S棟703号室

早稲田大学 理工学研究所 酸素輸液プロジェクト

TEL(03)5286-3122 FAX(03)3205-4740

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

TEL(03)3265-8961 FAX(03)3264-1995