

人工赤血球（ヘモグロビン ベシクル）製剤の新しい利用法

酒井 宏水

輸血治療は現行の医療に不可欠であり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、危機的出血にある傷病者に対し輸血が出来ない状況がある。我々は輸血治療を「補完」するため、人工赤血球(Hemoglobin vesicles, Hb-V)を開発し、その性能を多角的に研究してきた。日赤や医療機関等で発生する使用期限の過ぎた NAT 検査済み赤血球からウイルス不活化・除去工程を経てヘモグロビンを精製単離し、諸工程を経て、緊急時にいつでも投与できる人工赤血球製剤に「再生」できる。本研究は、厚労科研、AMED 臨床研究・治験推進研究事業として推進され、製造法が確立され、また非臨床試験により輸血代替としての安全性と有効性に関する膨大な知見を得ている。さらに、Hb-V の物理化学的利点を活かすことにより、他の用途にも応用が可能であることも解ってきた。

キーワード：血液製剤代替医薬品、人工血液、人工酸素運搬体、Hb-based oxygen carriers (HBOCs)

1. はじめに

日本の献血—輸血システムの安全性は世界最高水準である。そして輸血は医療に不可欠の、有効な治療行為として国民の医療と健康福祉に多大な貢献をしている。しかし、危機的出血にある傷病者に対し輸血が極めて困難となる状況がある。先ず、離島・へき地医療、夜間救急、緊急手術の現場では、輸血用血液を確保できない場合がある。プレホスピタルの現場では、救急救命士が重度傷病者に対して輸血することはできない。「産科危機的出血への対応ガイドライン」によれば、周産期管理の進歩により母体死亡率は著明に低下したものの、出血は依然、母体死亡の主要な原因とされている。通常分娩でも大量出血は起こりうるため、予期せぬ大量出血の対応が遅れ、搬送中に心停止する事例が後を絶たない¹⁾。大規模自然災害(東南海トラフ、首都直下型地震)、テロ、有事の際、輸血用血液の大量需要と迅速な供給の必要性にどう備えるか、国家的な危機管理対応策が必要とされている。他方、少子高齢化のため今後、血液が慢性的に不足するとの試算が公表され、不安を残している(表1)。

これら課題の解決のための一助として、当研究班では、輸血治療を「補完」することが期待される人工赤血球(ヘモグロビン ベシクル, Hb-V)を開発してきた²⁾³⁾(図1)。医療機関で発生する期限切れ赤血球(廃棄血)は、諸工程を経て、感染源を含まず、血液型がなく、長期保存に耐え、緊急時にいつでも投与できる Hb-V 製剤に「再生」される。これまでに、厚生労働科学研

究(創薬基盤推進研究事業)や、日本医療研究開発機構(AMED)臨床研究治験推進研究事業(2015~2017)などとして推進され⁴⁾、動物投与試験により安全性と有効性に関する知見を得てきた。

2. Hemoglobin-based oxygen carriers

血液に含まれる蛋白質のうち、最も沢山あるのがヘモグロビン(Hb)である。Hbは酸素を可逆的に結合—解離する蛋白質であり、血液の酸素輸送機能が生命維持にとって最も重要な要素であることを意味しているのかもしれない。しかし、高等動物ではHbは赤血球(長径:8 μ m)の袋の中に極めて高濃度(35g/dl)に封じ込まれており、最も沢山あるにも関わらず、溶血によって一旦赤血球の外に遊離すると、様々な副作用(毒性)を生じる。Hbを使った人工酸素運搬体(Hb based oxygen carriers (HBOCs))の研究は随分と長い歴史がある。Hbの毒性は早くから知られていたため、二量体への解離を抑制するために分子内架橋(crosslink)をしたり、血管外漏出を低下させる目的で分子量を大きくするために重合(polymerize)したり、あるいは水溶性高分子を結合させて(polymer conjugation)大きくするなど、実に数多のCell-free HBOCsが試され、欧米では臨床試験が先行していた⁵⁾。これは、製造法が極めて簡単であることによる。しかし、修飾Hb溶液系は内因性NOと速やかに反応し失活させ、血管収縮や心筋毒性などの副作用が確認されたため、多くの企業が開発から撤退した。修飾Hbの臨床試験を牽引していた米国

表1 輸血が困難（不可能）な危機的出血を，人工赤血球製剤の投与で克服できないか？

状況	対応策（案）
離島・へき地医療，夜間救急，緊急手術，産科危機的出血 プレホスピタルの現場 大規模自然災害（南海トラフ，首都直下型地震）・テロ・有事 少子高齢化の影響で，将来的に血液が不足する可能性	輸血用血液の緊急確保が極めて困難になる場合に備え，人工赤血球製剤を備蓄する。 救急救命士が重度傷病者に対して直ちに人工赤血球製剤「＝輸液」を投与できれば，救命率が向上する可能性がある。 多数の負傷者が発生，血液の大量需要の対応に備え，人工赤血球を常備する。 廃棄血液を人工赤血球に再生し，有効利用する。

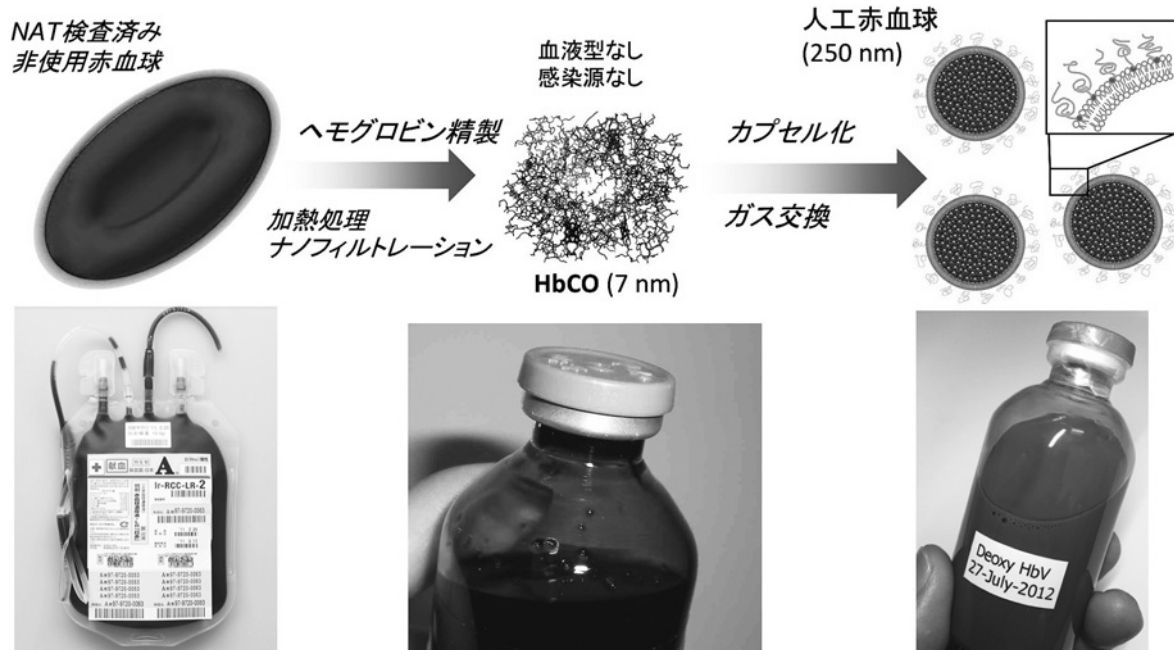


図1 非使用赤血球からヘモグロビンを精製し，人工赤血球に加工する。

Sangart社は，2013年にPEG-Hb (Hemospan)の開発を中止した。Hemospanの高い膠質浸透圧，Hb濃度が僅か4.8g/dl，酸素親和度8Torrなど生理条件を逸脱した特徴は，当初より多くの研究者から疑問視されていたが，結局のところ十分な酸素運搬効果が実証されなかったことが開発中止の理由と考えられる。1980年代に開発が開始された味の素社の安定化ヘモグロビン (pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene) はその後，米国企業に技術移転され，NOとの高い反応性を逆手に取り昇圧剤としてPhase 3まで進んだが，プラセボと比較して死亡率が高い結果となり，開発を断念した⁶⁾。実に30年余を要した結論である。Hbの化学修飾では，Hbの毒性を完全には遮断できないと考えられる。

3. 人工赤血球とは？

Hb溶液をリポソームに封入した形式の人工赤血球 (Hb-V)は，上述のNOに関連する副作用や血管外漏出を脂質膜で遮蔽でき⁷⁾，また微粒子分散液として膠質浸透圧は示さず，Hb濃度は10g/dlに設定され Transfusion trigger ([Hb]=6~8g/dl)よりも高く，酸素親和度

も適度に調節され，文字通り赤血球代替物として使用できる³⁾。

Hb-Vの原料となるヒトHbは，非使用ヒト赤血球から精製して得る。非使用ヒト赤血球の確保に関しては，薬食血発1127号第1号「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく公募⁸⁾に従って日本赤十字社に申請し，承認されたのち，日本赤十字社と奈良県立医科大学が契約を締結した後に近畿ブロック血液センターから研究用としてNAT検査済み非使用赤血球の譲渡を受けている。赤血球からのHbの精製工程には，赤血球の洗浄，溶血とストロマ成分の限外濾過膜による除去，一酸化炭素結合 (HbO₂→HbCO)，60℃での加熱処理，変性夾雑たんぱく質の除去，ナノフィルトレーション，脱塩・濃縮，無菌濾過の各工程が含まれ，得られる高純度・高濃度HbCO溶液は極めて安定で，収率も高く，原料として備蓄が可能となる。加熱処理とナノフィルトレーションによるウイルス不活化・除去工程については，ウイルスクリアランス試験の結果から，その妥当性が確認されている。このHb溶液をカプセル化する工程では，混合脂質(DPPC/cho-

表2 人工赤血球製剤の特徴

No.	特徴
1	血液型がないので、投与前の交叉試験は不要。
2	感染源がない (NAT 検査済み期限切れ赤血球から Hb を精製する工程で、加熱処理・ナノフィルトレーションを導入し、ウイルス不活化・除去を徹底し、安全性を高めている)
3	室温で長期間保存ができ、いつでも必要時に投与できる。赤血球より極めて安定。
4	粒子径が 250 ~ 280 nm であり、赤血球 (8,000 nm) より小さく、血漿中に均一に分散する。赤血球が通過できない狭窄部位を通過する。また plasma skimming や腫瘍血管において血漿の流れさえあれば、その流れに乗って酸素を運搬できる。
5	Hb-V 製剤の Hb 濃度は 10g/dl であり、Transfusion Trigger (6 ~ 7g/dl) より高い。
6	生体適合性の高い脂質から構成されたリボソーム内部に高濃度 Hb が内包されている。
7	人工赤血球微粒子の占有体積約 40% の濃厚分散液である。
8	老化赤血球と同様に細網内皮系に捕捉され、分解、排泄される。
9	血中機能半減期は数日程度なので、輸血までの繋ぎとしての利用が適当である。
10	遊離 Hb の様々な毒性は、リボソーム内に濃度高く封入することで遮蔽される。

lesterol/負電荷脂質/PEG 脂質) の粉末と Hb 溶液を特殊な条件で混練することにより容易に行われ、内包されなかった Hb の除去、光反応による CO 除去 (HbCO → HbO₂)、脱酸素化 (HbO₂ → deoxyHb) などの工程を経て長期保存可能な Hb-V が製造される。Hb 精製の工程で血液型物質や感染源を完全に排除してあり、また長期間備蓄が可能なので、緊急時に直ちに使用できる利点を有する。その他の特徴も含め表2にまとめた。

国内では T 社が 1990 年代から 2012 年まで LEH という物質を開発したが、所期の目標を達成できず開発を中止している⁸⁾。この物質は Hb を脂質膜で包む点では Hb-V に似ているが、その脂質成分が血液適合性に乏しく、補体活性による疑似アレルギー反応の出現や凝固活性を増強すること、Hb 濃度が僅か 6g/dl に設定され酸素運搬能力が低いことが原因であった。これらの問題は、本研究班が開発している Hb-V 製剤では克服されている。安全性の確認は多角的に行なわれ、結果も公表されており^{9)~15)}、我が国独自の技術を早期に実現させ、世界をリードする必要がある。

4. 危機的出血に対する輸血治療までの「繋ぎ」の役割を担う人工赤血球製剤の可能性

これまでに当研究班で実施してきた動物投与試験による効能の評価結果は、殆ど全てが学術誌に発表されている (表3)^{16)~44)}。Hb-V の酸素運搬機能を端的に示す動物実験として、ラットの循環血液量の 90% を Hb-V で置換した。麻酔したラットの頸動脈から 1ml の脱血、頸静脈から 1ml の Hb-V 投与を繰り返し、ヘマトクリット値が 5% 以下になるまで交換した (図2)。Hb-V は赤血球と同様に膠質浸透圧を持たないので、5% アルブミン溶液を併用した。アルブミンのみで血液稀釈をすると代償機能により最初は心拍出量の 1.5 倍程度の増大がみられるがその後は低下し、全例が 90% 交換を待たずに死亡する。対して Hb-V/アルブミンで交換すると、全例が生じた¹⁶⁾。当時、血液がここまで稀釈される状

況は臨床的にはあり得ないと考えていた。しかし、受傷現場で出血が酷く止血手段が無い状況 (uncontrolled hemorrhage) では、輸液を絶えず注入することになり、ヘマトクリットが低下する。このような状況において、Hb-V の投与ができれば、一命を取り止め、輸血治療までの繋ぎとして十分に効果を発揮できる。ラット外傷性制御不能出血モデルでも、Hb-V を投与し続けることにより延命されることを確認している¹⁹⁾。他方、循環血液量の 40~50% を急速脱血してショック状態としたラット、ウサギ、ビーグル犬に等量の Hb-V を投与することにより蘇生でき、血行動態、血液ガス組成など対照群の脱血液を投与した場合と同等に推移し、全例が生ずることを確認した^{20)~28)}。1年間保管した Hb-V を出血性ショック状態のラットに投与し、十分な蘇生効果があること、また post-transfusion lung injury が無い結果も得ている²⁶⁾。このように、Hb-V は、自然災害や有事の大量需要に対して、血液型に関わらず、いつでも何処でも必要時に投与して延命ができる酸素輸液剤として期待できる。Hb-V を血管内投与した後の機能半減期は数日であり、赤血球の寿命と比較すると短い。輸血治療までの繋ぎとして 8 時間程度も持てば十分とも言われており、期待に沿う効力を発揮すると考えられる。

上述の産科危機的出血により緊急輸血が必要となった場合、輸血用血液の入手が間に合わない状況で、備蓄しておいた Hb-V を血液型に関係なく直ちに投与して生命の危機を乗り切ることができれば、医療上の有用性は極めて高い。これまでに妊娠ラットを用いた Hb-V の投与試験では、胎盤通過性がなく胎仔には移行しないことが確認された⁴⁵⁾。現在、ウサギを用いた産科危機的出血モデルを用いた検討が、当研究班で進められている。

5. 人工赤血球製剤の特徴を活かした応用例

このほか、Hb-V は ECMO 回路の充填液として、血

表3 人工赤血球製剤の効能を実証した動物投与試験

使用目的	投与実験モデル (使用動物)	実験で得られた結果	文献
輸血治療までの繋ぎ、輸血治療の補完的役割	血液希釈 (90% 交換輸血) (Wistar rats)	Hct が 5% でも血圧、組織酸素分圧、酸素消費量を維持	16, 17
	血液希釈 (40% 交換輸血) (Wistar rats)	血液交換後、Hb-V の代謝過程と Hct が増加する過程を追跡	18
	外傷性制御不能出血 (Wistar rats)	生存時間の大幅な延長、洗浄赤血球の投与と同等の効果	19
	50% 出血性ショック蘇生、長期生存 (Wistar rats)	血液と同等の蘇生効果	20, 21
	反復 40% 出血性ショック蘇生 (Jpn white rabbits)	二回の出血蘇生で十分な効果、サイトカイン過剰産生の抑制	22
	出血性ショック (平均動脈圧 30 ~ 35mmHg) 蘇生 (NZ white rabbits)	十分な蘇生効果を発揮、血行動態、脳を含む組織酸素分圧の回復を確認	23
	50% 出血性ショック蘇生 (Beagle dogs)	中型動物での大量・急速蘇生、血行動態の詳細を確認	24
	40% 出血性ショック蘇生 (Beagle dogs)	蘇生後、全例が 1 年生存。血液生化学、組織病理学的検討も実施。	25
	40% 出血性ショック蘇生、1 年保存した Hb-V の投与 (Lewis rats)	1 年保存した人工赤血球の投与、輸血関連肺障害を低減	26
	片肺切除術中出血に対する投与 (C57BL/6 mice)	蘇生後、全例が長期生存	27
血小板減少症モデル、出血性ショック蘇生 (Jpn white rabbits)	十分な蘇生効果を発揮、血液凝固系に影響なし	28	
その他の酸素運搬体としての利用	体外循環回路 (ECMO) 充填液 (SD rats)	回路離脱後、高次脳機能の維持を確認	29
	脳虚血 (Wistar rats)	梗塞領域の増大を抑制	30
	皮弁辺縁部酸素化 (Syrian Golden hamsters, DDY mice)	側副経路を経由した酸素輸送を確認	31, 32
	妊娠中毒症 (胎盤収縮) (Wistar rats)	胎盤・胎仔酸素化を確認	33
	腫瘍の放射線治療効果増強 (C57BL/6 mice)	腫瘍組織の酸素分圧上昇と放射線治療効果の向上	34
	¹⁵ O-PET による酸素代謝測定 (SD rats)	脳血管障害の診断に有効	35
	摘出小腸灌流 (BALB/c mice)	2 時間の灌流後も小腸の蠕動運動を維持	36
	切断下肢灌流—再接着—機能回復 (Wistar rats)	再接着した下肢を使ってラットが歩行することを確認	37
	摘出肝臓灌流 (Cross-bred pigs)	UW 液による灌流に比較して灌流圧の低下、酸素消費量の増大を確認	38
	レーザー治療標的としての利用	血管腫レーザー治療効果増強 (Chicken wattle)	毛細管に対するレーザー照射効果が増大することを確認
一酸化炭素運搬体としての利用	出血性ショック蘇生 (Wistar rats)	CO 体の投与により再灌流障害を低減。CO は 6 時間以内にはば解離し、呼気中に排出される	40
	肺繊維化症、潰瘍性大腸炎 (Sea-ICR mice) 睪炎 (BALB/cN mice)	酸化的障害の低減、抗炎症作用による症状の緩和	41~44

液の希釈による酸素輸送量の低下を抑制することが期待される²⁹⁾。また切断四肢の再接合まで、あるいは移植臓器の保存において、Hb-V を灌流させることにより、臓器組織の機能を維持させることが期待される^{36)~38)}。

Hb-V が可逆的に酸素を結合解離し、粒子径が赤血球よりも小さく、また構造的に赤血球よりも安定であることの利点を活用することにより、様々な疾患に対しても有効であることがわかってきた。微小循環では細動脈の分岐で血漿分離 (plasma skimming) が発生し、ヘマトクリットが均一ではないことが一般的であるが、病態ではこれが顕著になる²⁾。更に腫瘍の毛細管は形状が歪で、赤血球が通過できない場合も多い。ここで、赤血球 (8 μm) よりも小さい Hb-V (250 nm) を投与すると血漿中に均一に分散するので、赤血球が到達しにくい組織でも Hb-V は血漿の流れさえあれば患部に到達し、酸素を運搬することができ、梗塞領域近傍や腫瘍組織の酸素化を向上することを動物実験で確認した^{30)~34)}。腫瘍組織の酸素化は、放射線治療の効率を高め、腫瘍成長を抑制することが確認されている。妊娠高血圧症候群では、胎盤形成過程で胎盤らせん動脈が

狭小化するため、血行不全が生じ、母子間のガス交換、栄養物質運搬、老廃物の代謝が抑制され、胎児の低酸素状態・子宮内発育不良が誘導される。ラットモデルにおいて Hb-V の投与により、胎盤・胎仔の低酸素状態を解除し、子宮内発育不良を改善することを確認した³³⁾。

皮膚に発生する血管腫は未熟な毛細血管が増殖して現れる良性の腫瘍で、レーザー治療により毛細血管を焼き切る治療法がとられる。レーザーのターゲットは赤血球内の血色素ヘモグロビンである。毛細血管内では、個々の赤血球は距離を隔てて流動するが、ここに Hb-V が投与されると、血漿中に分散するので、毛細血管内のヘモグロビン濃度を上昇させ、レーザー治療効果が上がることを実験的に実証した³⁹⁾。

毒ガスとして良く知られた CO は、実は体内でも微量に産生され、肝類洞血管拡張作用のほか、抗炎症作用、抗酸化作用、抗増殖作用を有することが知られている。CO を結合させた Hb-V は投与後数時間 CO を放出し、虚血再灌流障害、大腸炎、肺線維化症、睪炎等に対する有効性が動物投与試験から明らかになり、毒をもって毒を制する治療法として注目されている^{40)~44)}。

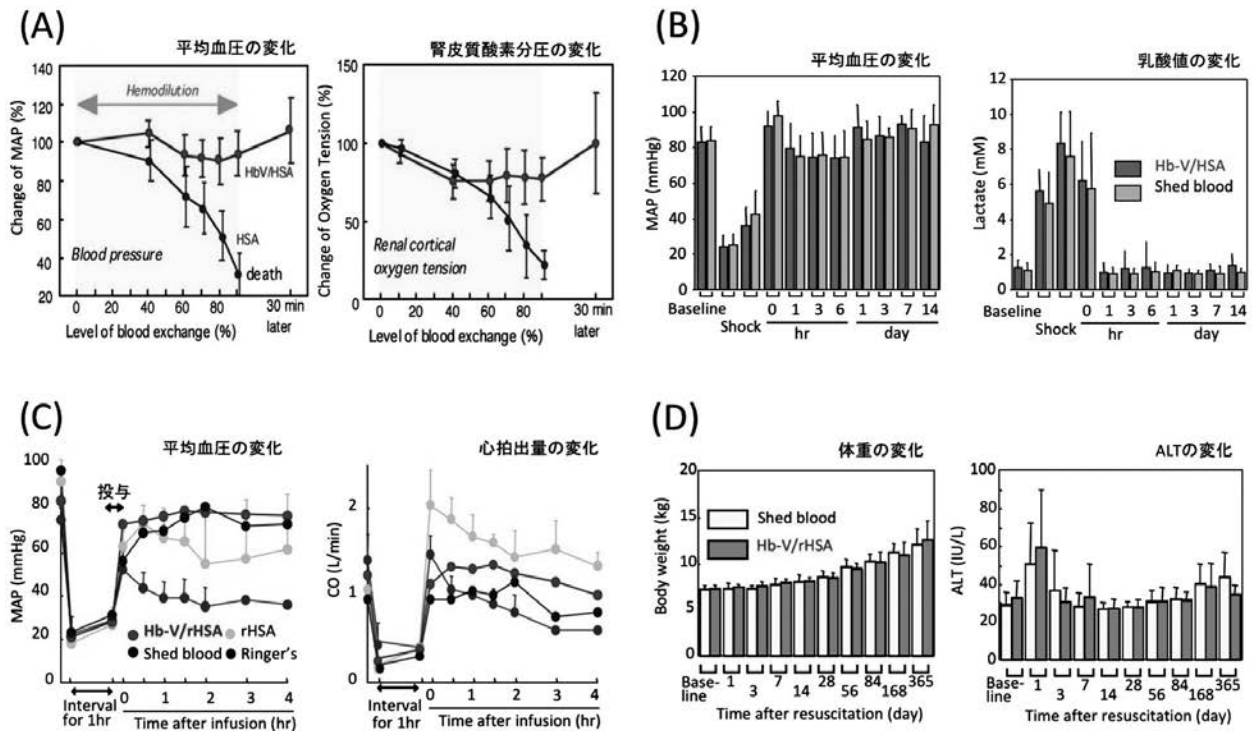


図2 人工赤血球の動物投与試験による有効性と安全性評価の例。(A) ラット・循環血液量の90%をHb-V/HSAで交換した。全例生存したのに対し、対照のHSA群は死亡(16)。(B) ラット・循環血液量の50%を脱血後、Hb-V/HSAで蘇生した。血液を投与した場合と同等の蘇生効果を示した(21)。(C) ビーグル犬・循環血液量の50%を脱血後、Hb-V/rHSAで蘇生した。血液を投与した場合と同等の蘇生効果を示した(24)。(D) ビーグル犬・循環血液量の40%を脱血、Hb-V/rHSAで蘇生した。その後1年間生存し、体重の増加がみられた(25)。

6. おわりに

Hbを用いる人工酸素運搬体の研究は、1980年代「厚生省血液研究事業」として、廃棄血を有効利用する目的で開始された⁴⁶⁾。近年、献血血液の供給体制の集約化が進み、廃棄血が減少している。しかし廃棄血は潜在的に予想以上に多く存在すると言われ、また輸血治療が存在する限り、廃棄血が無くなることはあり得ず、これを有効利用する課題は存続すると思われる。不規則抗体を有する献血液なども廃棄血として発生している。献血者の善意を無駄にしないために、日本赤十字社・医療機関で発生する廃棄血すべてを1カ所に効率よく回収し、人工赤血球の製造に利用するシステムの構築を提案したい。

2002年改正薬事法：衆議院厚生労働委員会決議(医薬品・医療機器の安全対策推進に関する件)には、「五.人工血液についてはその有効性および安全性が確保されたものの製品化が促進されるよう、研究開発の促進をはかること」が明記された。この方針のもと開発された人工赤血球が実用化され、輸血治療の一助となることを望む。

謝辞：本論文に掲載した研究の成果は、研究班をはじめ国内外の多くの共同研究者の先生のご尽力により得られたものです。記

して謝意を表します。本論文の内容の一部は、第66回日本輸血・細胞治療学会総会教育講演4の内容です。講演の機会を頂戴したことについて、学会関係者の皆様に感謝します。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし
本論文の内容の一部は、第66回日本輸血細胞治療学会教育講演4で発表された。

文 献

- 1) 照井克生：産科出血による母体死亡の現状と人工赤血球への期待。人工血液，24：18, 2016.
- 2) Sakai H: Overview of potential clinical applications of hemoglobin vesicles (HbV) as artificial red cells, evidenced by preclinical studies of the academic research consortium. J Funct Biomater, 8: 10, 2017.
- 3) Sakai H, Sou K, Tsuchida E: Hemoglobin vesicles as a transfusion alternative. Methods Enzymol, 465 (Liposomes Part G): 363-384, 2009.
- 4) 酒井宏水：備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究. 日本医療研究開発機構 臨床研究・試験推進研究事業—平成28年度研究成果報告書. https://www.amed.go.jp/program/houkoku_h28/0501050.htm

- 5) Natanson C, Kern SJ, Lurie P, et al: Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: A metaanalysis. *JAMA*, 299: 2304—2312, 2008.
- 6) Vincent JL, Privalle CT, Singer M, et al: Multicenter, randomized, placebo-controlled phase III study of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene in distributive shock (PHOENIX). *Crit Care Med*, 43: 57—64, 2015.
- 7) Sakai H, Sato A, Masuda K, et al: Encapsulation of concentrated hemoglobin solution in phospholipid vesicles retards the reaction with NO, but not CO, by intracellular diffusion barrier. *J Biol Chem*, 283: 1508—1517, 2008.
- 8) 金田伸一, 石塚隆伸, 後藤 博, 他: カプセル型人工酸素運搬体—リポソーム化ヘモグロビンの開発. *人工血液*, 21: 49—59, 2013.
- 9) 酒井宏水, 堀之内宏久, 東 寛, 他: 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の安全性試験. *人工血液*, 21: 36—48, 2013.
- 10) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, et al: Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J Pharmacol Exp Therap*, 311: 874—884, 2004.
- 11) Taguchi K, Urata Y, Anraku M, et al: Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG) ylated liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce the accelerated blood clearance phenomenon in mice. *Drug Metab Disp*, 37: 2197—2203, 2009.
- 12) Sakai H, Suzuki Y, Sou K, et al: Cardiopulmonary hemodynamic responses to the small injection of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs. *J Biomed Mater Res Part A*, 100A: 2668—2677, 2012.
- 13) Takahashi D, Azuma H, Sakai H, et al: Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive in ex vivo culture conditions. *J Pharmacol Exp Therap*, 337: 42—49, 2011.
- 14) Taguchi K, Miyasato M, Ujihira H, et al: Hepatically-metabolized and -excreted artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicles, can be safely used under conditions of hepatic impairment. *Toxicol Appl Pharmacol*, 248: 234—241, 2010.
- 15) Sakai H, Hara H, Yuasa M, et al: Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: H908—H915, 2000.
- 16) Sakai H, Takeoka S, Park SI, et al: 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*, 8: 23—30, 1997.
- 17) Izumi Y, Sakai H, Kose T, et al: Evaluation of capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model. *ASAIO J*, 43: 289—297, 1997.
- 18) Sakai H, Horinouchi H, Yamamoto M, et al: Acute 40 percent exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles (HbV) suspended in recombinant human serum albumin solution: degradation of HbV and erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks. *Transfusion*, 46: 339—347, 2006.
- 19) Seishi Y, Horinouchi H, Sakai H, et al: Effect of the cellular-type artificial oxygen carrier hemoglobin vesicle as a resuscitative fluid for prehospital treatment: experiments in a rat uncontrolled hemorrhagic shock model. *Shock*, 38: 153—158, 2012.
- 20) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, et al: Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human sersum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit Care Med*, 32: 539—545, 2004.
- 21) Sakai H, Seishi Y, Obata Y, et al: Fluid resuscitation with artificial oxygen carriers in hemorrhaged rats: profiles of hemoglobin-vesicle degradation and hematopoiesis for 14 days. *Shock*, 31: 192—200, 2009.
- 22) Yoshizu A, Izumi Y, Park S, et al: Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicle, maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor-alpha. *ASAIO J*, 50: 458—463, 2004.
- 23) Terajima K, Tsueshita T, Sakamoto A, et al: Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles in a rabbit model of acute hemorrhagic shock. *Shock*, 25: 184—189, 2006.
- 24) Yamamoto M, Horinouchi H, Kobayashi K, et al: Fluid resuscitation of hemorrhagic shock with hemoglobin vesicles in Beagle dogs: pilot study. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 40: 179—195, 2012.
- 25) Ikeda T, Horinouchi H, Izumi Y, et al: Cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier as a resuscitative fluid for hemorrhagic shock: acute and long-term safety evaluation using beagle dogs. In: Kim HW, Greenburg AG, eds, *Hemoglobin-based oxygen carriers as red cell substitutes and oxygen therapeutics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, 501—524.

- 26) Tokuno M, Taguchi K, Yamasaki K, et al: Long-term stored hemoglobin-vesicles, a cellular type of hemoglobin-based oxygen carrier, has resuscitative effects comparable to that for fresh red blood cells in a rat model with massive hemorrhage without post-transfusion lung injury. *PLoS ONE*, 11: e0165557, 2016.
- 27) Kohno M, Ikeda T, Hashimoto R, et al: Acute 40% exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles in a mouse pneumonectomy model. *PLoS ONE*, 12: e0178724, 2017.
- 28) Hagiwara K, Kinoshita M, Takase B, et al: Efficacy of resuscitative transfusion with hemoglobin vesicles in the treatment of massive hemorrhage in rabbits with thrombocytopenic coagulopathy and its effect on hemostasis by platelet transfusion. *Shock* (in press).
- 29) Yamazaki M, Aeba R, Yozu R: Use of hemoglobin vesicles during cardiopulmonary bypass priming prevents neurocognitive decline in rats. *Circulation*, 114 (suppl 1): I220—I225, 2006.
- 30) Komatsu H, Furuya T, Sato N, et al: Effect of hemoglobin vesicle, a cellular-type artificial oxygen carrier, on middle cerebral artery occlusion- and arachidonic acid-induced stroke models in rats. *Neurosci Lett*, 421: 121—125, 2007.
- 31) Plock JA, Tromp AE, Contaldo C, et al: Hemoglobin-vesicles reduce hypoxia-related inflammation in critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med*, 35: 899—905, 2007.
- 32) Plock JA, Rafatmehr N, Sinovcic D, et al: Hemoglobin-vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic skin in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297: H905—H910, 2009.
- 33) Li H, Ohta H, Tahara Y, et al: Artificial oxygen carriers rescue placental hypoxia and improve fetal development in the rat pre-eclampsia model. *Sci Rep*, 5: 15271, 2015.
- 34) Yamamoto M, Izumi Y, Horinouchi H, et al: Systemic administration of hemoglobin vesicle elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J Surg Res*, 151: 48—54, 2009.
- 35) Tiwari VN, Kiyono Y, Kobayashi M, et al: Automatic labeling method for injectable ¹⁵O-oxygen using hemoglobin-containing liposome vesicles and its application for measurement of brain oxygen consumption by PET. *Nucl Med Biol*, 37: 77—83, 2010.
- 36) Verdu EF, Bercik P, Huang XX, et al: The role of luminal factors in the recovery of gastric function and behavioral changes after chronic *Helicobacter pylori* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295: G664—G670, 2008.
- 37) Araki J, Sakai H, Takeuchi D, et al: Normothermic preservation of the rat hind limb with artificial oxygen-carrying hemoglobin vesicles. *Transplantation*, 99: 687—692, 2015.
- 38) Shonaka T, Matsuno N, Obara H, et al: The application of perfusate with human-derived oxygen carrier solution under subnormothermic machine perfusion for donation after cardiac death (DCD) liver grafts in pigs. *Transplantation Proc* (in press).
- 39) Rikihisa N, Watanabe S, Satoh K, et al: Photosensitizer effects of artificial red cells on dye laser irradiation in an animal model assuming port-wine stain treatment. *Plast Reconstr Surg*, 139: 707e—716e, 2017.
- 40) Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi H, et al: Hemoglobin-vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. *Shock*, 31: 507—514, 2009.
- 41) Nagao S, Taguchi K, Sakai H, et al: Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials*, 35: 6553—6562, 2014.
- 42) Nagao S, Taguchi K, Miyazaki Y, et al: Evaluation of a new type of nano-sized carbon monoxide donor on treating mice with experimentally induced colitis. *J Control Release*, 234: 49—58, 2016.
- 43) Nagao S, Taguchi K, Sakai H, et al: Carbon monoxide-bound hemoglobin vesicles ameliorate multiorgan injuries induced by severe acute pancreatitis in mice by their anti-inflammatory and antioxidative properties. *Int J Nanomed*, 11: 5611—5620, 2016.
- 44) Taguchi K, Nagao S, Maeda H, et al: Biomimetic carbon monoxide delivery based on hemoglobin vesicles ameliorates acute pancreatitis in mice via the regulation of macrophage and neutrophil activity. *Drug Delivery*, 25: 1266—1274, 2018.
- 45) Kaga M, Ohta H, Lee Y, et al: Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusion for 7 days in pregnant rats and fetuses. *Life Sci*, 91: 420—428, 2012.

- 46) 松橋 直：血液製剤の規格および試験法に関する研究
総括研究報告, 厚生省血液研究事業 昭和 60 年度研究報告集, 1985, 214—260.

ARTIFICIAL RED CELLS (HEMOGLOBIN VESICLES) AS A TRANSFUSION ALTERNATIVE AND THEIR NEW CLINICAL APPLICATIONS

Hiromi Sakai

Department of Chemistry, Nara Medical University

Abstract:

The blood donation and transfusion system has contributed significantly to the human health and welfare. However, there still exist emergency situations where blood transfusion is not available. To complement the blood transfusion system, we have developed artificial red cells (hemoglobin vesicles, Hb-V) with the intention of their clinical use. Hemoglobin is purified from expired NAT-inspected RBCs via virus inactivation and removal procedures and regenerated as storable artificial red cells. We established a basis for production processes and clarified the safety and efficacy of Hb-V as a transfusion alternative through preclinical studies with the help of grants from MHLW and AMED. On the other hand, new potential applications of Hb-V are being clarified by taking the advantages of its unique physicochemical properties.

Keywords:

Transfusion alternative, artificial blood, artificial oxygen carriers, Hb-based oxygen carriers (HBOCs)

©2018 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.jstmct.or.jp/>