

人工血液

第5巻 第3号 1997年9月

座談会 血小板代替物 — その開発の現状	池田康夫	23
原著 人工骨髄の確立	平 敏夫	29
ヒト由来肝癌細胞を用いたラジアルフロー型バイオリアクターによるアルブミン大量産生	蓮村 哲	33
学会報告		
第9回北海道輸血シンポジウム		39
事務局たより		45

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 5 No. 3 September, 1997

Interview:

Platelet Substitutes — Present Status of Its Development	Yasuo Ikeda	23
--	-------------	----

Original Article:

Establishment of Artificial Bone Marrow	Toshio Taira	29
---	--------------	----

A Fine Performance of Albumin Production of Human Liver Cancer Cell Lines Using a Radial Flow Bioreactor ...	Satoshi Hasumura	33
--	------------------	----

Report:

9th Hokkaido Symposium on Transfusion Medicine		39
--	--	----



日本赤十字社の血漿分画製剤は、善意の献血から創られています。

平成7年度 東京都内小・中学生「献血の絵」小学生低学年の部・金賞
光塩女子学院初等科・3年 坂 真理子

日本赤十字社の
血漿分画製剤

指 クロスエイトM250 指 クロスエイトM500 指 クロスエイトM1000
指 赤十字アルブミン

日本赤十字社 〒105 東京都港区芝大門1-1-3

文献請求先 日本赤十字社中央血液センター医薬情報部
〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31 TEL.03-5485-6607

血小板代替物 — その開発の現状

池田 康夫

聞き手 池淵 研二

池淵：今日は臨床と研究で大変お忙しいところ、人工血液の座談会に出席していただき有り難うございます。先生は血小板研究と血液臨床で大変ご活躍されており、以前より是非一度お話を直にお伺いしたいと思っておりました。人工血液の編集に携わるようになり、その分野の論文を目にすることになってから、先生のお書きになつていらっしゃる血小板代替物、特に先生が研究を進めておられる血小板の糖タンパクをリポソームの表面に固相化して血小板の機能の一部を代替えさせるPlateletsomeの研究に大変興味を持っております。今日は是非そのあたりのお話を伺いしたいと考えております。

■1. 血小板代替物はなぜ必要なのか

池淵：血小板代替物の研究はどうして必要なのか、そのあたりの先生のお考えをまずお聞かせ下さい。

池田：1960年代に血小板輸血が導入されてから、その使用量は年々増大し、特に80年代は米国においても約7年間に使用量が2倍に伸びたと言われています。実際慶應大学病院でも1990年から1995年の間に2倍近くに増加しています。このうち約7割が血液疾患への使用であり、一人の患者に長期にわたり大量の血小板輸血を余儀なくされていることも少なくありません。血小板減少症や血小板機能異常症が原因となって起こる出血の治療や予防に対しては血小板輸血が唯一の効果的治療であり、これに代わる治療法は現在のところ存在しません。しかし最近血小板輸血、あるいは同種血輸血そのものに対して種々の問題点が指摘されるようになったのは皆さんも知っていると思います。同種血輸血そのものに関しては、感染症の伝播、特に肝炎ウイルスやAIDSウイルスが問題にされています。血小板輸血の場合、赤血球輸血よりもドナーの数

が多くなることが感染のリスクを大きくします。そのため日赤はできるだけ一人のドナーから高単位の血小板製剤をアフェレーシスで採取し供給する体制を確立し、現在では殆ど全ての血小板製剤をシングルドナーから採取できるようになってきています。血小板製剤を純粋に血小板のみの製剤にすることははなはだ難しく、多少白血球が混入してきますが、これが同種免疫を成立させる原因となり、多くの場合抗HLA抗体が、稀に血小板特異抗原に対する同種抗体が検出され、輸血不応症の原因になります。ドナーの数を減らすためにアフェレーシス由来血小板製剤が導入できたことが、その予防になりますが、一旦抗HLA抗体ができ輸血不応症に陥った症例にはHLA適合血小板を輸血する必要がでてきます。その他同種血輸血には生物製剤ゆえの種々の副作用が伴うことがあります。特に血小板製剤は室温で保存されるため、混入している白血球が産生する種々の炎症性サイトカインが発熱やアレルギー反応やショックなどの副作用を生じさせる場合があると考えられています。同種輸血の安全性を高める体制の充実が現在ますます必要であると認識されるようになっていますが、これらのリスクを回避するため、血小板代替物を開発したいというのが、一つの理由と考えられます。

池淵：昨年米国でFrozen Platelets and Platelet Substitutesについてシンポジウムが開催され、出席しました。その際、止血栓、タンパク、微細形態、凍結、ウイルス不活性化の領域の専門家や企業が参加していました。開催された場所が米国海軍病院の敷地内だったので、かなりの数の制服を着た軍人が参加していたので多少びっくりしました。冒頭で主催者が基調講演をされたのですが、血液代替物の開発研究が軍隊に関連した研究でもあったような話だったので、二度びっくりしましたが、そのあたり先生にか情報をお持ちですか。

池田：日本の中で考えた場合、現在の供給体制に加えて血液代替物があつたら良いだろうと思われるには、僻地や災害発生時の供給には大変好都合だと思います。米国では血小板製剤の改良について特に軍部の関心が高く、第一線

Yasuo Ikeda, 慶應義塾大学医学部内科, 〒106 東京都新宿区信濃町35. Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinano-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 106, Japan.

Kenji Ikebuchi, 北海道赤十字血液センター研究部, 〒063 札幌市西区山の手2条2丁目, Research Division, Hokkaido Red Cross Blood Center, 2-2 Yamanote, Nishi-ku, Sapporo 063, Japan.

の戦場にいかに血小板製剤を供給するかが真剣に議論されています。US Army Combat Casualty Care Research Program, Naval Medical Research and Department Commandなどと呼ばれる研究組織がFDAやNIHの協力の下に多額の予算を使って研究をリードしている状況です。血小板製剤はどうしても室温で保存され、保存期間も数日と短いため、軍部の要求する形には現行のままでは難しく、低温保存や凍結保存に加え代替物にも注目しているのは自然かもしれません。

池淵：赤血球代替物の場合は、交通事故や路上での外傷、あるいは救急車の中で大量出血のために赤血球輸血が一刻を争って必要とされる時には、血液型検査や交差試験もせずに、酸素運搬能を有する赤血球代替物を投与できれば、大変すばらしいと思います。一刻を争って血小板輸血をしないと患者生命が危うい事態もあると思いますが、赤血球ほど深刻ではないように思います。

池田：血小板製剤は日赤の努力で、ほぼ臨床側の要求する量の血小板製剤が供給できるようになってきており、入院している患者さんにとっては、例えば東京に直下型地震が発生し、献血活動が停止し交通手段も確保が難しくなる



池田康夫 先生

ような事態を考えなければ、血小板製剤が届かないために危険な事態になることはそれ程多くないと思います。ただしそういう災害への対策も考えておかないといけないのも事実です。ただ血液代替物研究を進めるもう一つの目標は、同種血輸血ができるだけ回避していくといふことがあります。輸血は、皆さんもご存じのように、かつてのように輸血ができれば命が助かるという時代ではなく、輸血は安全でなくてはならないという時代に入っています。輸血行為により肝炎を伝播させてはいけないし、AIDSを伝播させてもいけない。もっと日常的なことを申しますと、同種免疫、アレルギー、アナフィラキシーショック、蕁麻疹などを起こしてはならない、致命的な副作用である移植片対宿主病を起こしてはならない時代に我々はいるということを認識する必要があります。供給体制の問題以外に、血液の安全性を真剣

に追求する時代なのです。従って献血ドナーのスクリーニング検査はますます鋭敏で確実なものが要求されています。例えばウイルス感染症ではウンドウピリオドという問題がまだ解決されず、その対策が真剣に論じられています。ウイルスに対する抗体が産生されるまでの期間に採血された血液の中には、ウイルス陽性である血液が供給される可能性があり、その可能性をできる限り排除する努力がなされています。GVHDは血液製剤に対し放射線を照射することで、回避できつありますが、全国的に情報を伝えても、未だ発生をゼロにするところには至っていません。頻度的に多く見られるアレルギー反応やアナフィラキシー反応、蕁麻疹などは多くの場合一過性に起こり、患者の生命を危険な状態に陥らせる危険は少ないとても、患者にとっては不快なものであり、それを避ける手段を講じるべきですが、その成因は未だ特定できず、完全に回避はできません。安全な輸血療法を開拓するという方針の中で血液代替物が登場するわけです。輸血治療の中で、血漿分画製剤、例えばアルブミンや凝固因子は、その原料となる血漿がなかなか献血血液から十分確保できない状況であるので、遺伝子工学的手法を用いてリコンビナント製品の開発が進められていますが、この場合でもやはり安全性を高めるためにもリコンビナント製品の開発が進められている事情もあると思っています。

池淵：先生有り難うございます。私も日赤に勤める立場として、日頃から血液製剤の安全性を考える機会が多いのですが、先生の方からその状況をお話いただきました。

■2. 血小板代替物に求められる条件

池淵：赤血球代替物は酸素運搬機能を有し、当面の緊急時に患者の循環動態を維持できることが望まれていると思っていますが、赤血球よりははるかに複雑な機能を有する血小板に関し、その代替物はどこまでその機能を代用できるものを開発すべきか、あるいはどこまで似たものを開発できるか、に関し先生のご意見をいただけませんか。

池田：血小板代替物の臨床応用を考えるにあたって、何をどこまで代替物に期待するかは重要なポイントです。これまでに数々の人工臓器組織が研究開発されてきましたが、それらを参考にして話を進めてみます。開発の難易を規定する条件として、代用すべき臓器の機能の複雑さ、その機能が常に発揮されるべきか、それとも必要な場合だけに発揮されれば良いのか、いわゆる機能がコントロールできるか、また対象とする臓器の機能の一部を代用すればよいか100%代用しなければいけないのか、機能を一時的に代用するのでよいか永久になのか、などが考えられます。またその素材としてはハイブリッド型(生体物質と人工物の共存)と完全人工物とが考えられます。血小板代替物を考えた場合、生体組織、細胞と人工物質を組み

合わせることにより、より自然に近い形で血小板機能を代行するものが開発できると期待しています。出血部位だけに効率よく血栓を形成し、しかも組織修復後には血栓は溶解されてなくなるような、血小板の有する調節機能をもたせるには、ハイブリッド型がより現実的であると思われます。

池淵：先生のおっしゃる調節機能を持たせることはかなり難しい工夫だと予想されますが。

池田：輸注された人工血小板は流血中では勝手に機能してはならない、つまり血管内で血栓をつくることがないようにする必要がある。これは当然ですね。血管傷害部位で始めてその機能が発揮されることが前提になります。血小板表面にはその機能発現に重要な膜糖タンパク受容体が存在しますが、これらは通常、非活性化状態にあり、出血部位などで内皮下組織が露呈された部分で機能し血小板血栓を造ります。このあたりの工夫が大切な開発条件だと私は考えています。

池淵：あと大量に製造が可能であること、長期保存ができ、即使用可能であること、コストが低いこと、なども求められますか。

池田：その通りです。その他、投与することで残存する正常血小板の機能を抑制しないこと、またフィードバックによる正常血小板産生に抑制がないこと、なども条件になると思います。

■3. 開発途上の血小板代替物

■3.1. 草分け的な研究

池淵：血小板代替物のいろいろなモデルがあると思います。また実際米国では臨床試験の段階に入っている製剤があると聞いていますが、先生、そのあたりをご紹介していただけですか。

池田：開発の草分け的なモデルとしては1980年にCollerが発表した、ビーズにフィブリノーゲンをコートしたものが挙げられます。このビーズが血小板と反応すること、血小板が刺激状態であることにより反応が迅速に起こることが示されています。同様な系がAgamらによって報告されていますが、固定した血小板にフィブリノーゲンを共有結合させたものを作成すると、通常の血小板を刺激剤で凝集させたなかにこのものが巻き込まれることが示されました。凝集反応を仲介するリガンドであるフィブリノーゲンを担体に固相化することによって、残存する正常血小板の凝集を増強しようという基本概念の確立に貢献した仕事と考えられます。1985年頃からは血小板膜糖タンパクの機能が徐々に明らかにされ、同時にそれらのタンパクが精製されるようになったため、これをリポソーム

表面に導入したものが作成されるようになりました。in vitroの検討では凝集および粘着などの機能を発揮することが示されています。

池淵：血小板代替物を考えるようになってから、その複雑な機能をどのように代替物にもたらせるかが、あまりに難解なテーマでしたが、臨床的に血小板減少があるといつても血管内皮に沿った領域には多分白血球と同じようにmarginal poolがあるでしょうし、循環血液中にも5000から10000の血小板は存在するわけですから、その残存血小板と共同して機能するものを補給するという考えがあることを知って、少し安心しました。

■3.2. 赤血球を担体として用いる

池田：Agamらは1992年に、担体として正常ヒト赤血球を選択しその表面にフィブリノーゲンを共有結合で固相化する系を発表しました。この赤血球は正常血小板と混合すると凝集塊中に巻き込まれることが分かり、in vivoで血小板減少モデルラットに輸注するとラットの出血時間が短縮できることが報告されました。彼らの報告によると、赤血球の表面に共有結合させる反応によって赤血球の形態、浸透圧脆弱性、その他の機能にも障害がでなかつたとされています。またマクロファージによる貪食の点でも変化がなかったとされています。

池淵：私は現在、赤血球代替物としてヒトヘモグロビンをリポソームの中に内包させた製剤を用いて、種々の生体適合性を検討しているところですが、実際末梢血から採った単球と数時間培養しますと、リポソームが簡単に貪食されてしまい、これでよいのかな、と疑問を持っています。血小板代替物の場合、生体に投与した後止血には効果があつてもすぐ血液中からクリアされてしまうと、その後また連投与するのでよいのか、一時しのいだ後は献血由来の血小板製剤の輸血をすべきか、代替物の設計を考える上で気になるところです。そこでマクロファージという言葉ができるとすぐに反応する状態になっています。

池田：あくまで目標は効果が持続することと考えています。ただし難しい面は徐々に解決していくという方針でもよい段階とも思っていますが。

同様の手法でCollerらも1992年にThromboerythrocyteというものを発表しました。フィブリノーゲンのアミノ酸配列の中のRGD配列は血小板凝集の鍵を握る血小板糖タンパクGPIIb/IIIaとフィブリノーゲンの結合に重要な部位であり、その配列を合成し、赤血球膜表面に共有結合させたものです。活性化血小板と特異的に反応し凝集に参画し、この凝集がGPIIb/IIIaに対する抗体で抑制されることも示されました。またコラーゲン上に粘着した血小板に対してもこのThromboerythrocyteが粘着し、血管損傷部

位で血小板粘着を補強する可能性が示唆されました。マイクロウェルを用い、血小板とこのThromboerythrocyteを混ぜた系で、凝集塊が赤く写っている写真が論文に掲載されていたのをよく覚えています。彼らの計算によると、約50mLの自己血から約18単位の血小板に相当する製剤が製造できるとされています。

池淵：私もその論文を読んだことがあります。面白い系ですね。ただ担体が赤血球という点、その保存期間には当然限界があるものと予想されます。共有結合を施した時点では担体となった赤血球の機能に障害がなかったとしても、赤血球には何らかの傷が付いていることが予想され、21日間保存に耐えない可能性があると思います。また当初MAP保存液が導入された時最大42日間の保存が赤血球で可能となると考えられましたが、そうなってもやはり42日間しか保存できないという限界はつきまといますね。もう一つ、私は血液センターに勤務するようになってから血液製剤のウイルス不活化のテーマも考えていましたが、血漿製剤に比べ赤血球製剤に対するウイルス不活化は大変難しい領域と感じています。担体として生物製剤、赤血球を利用する限りそのウイルス不活化が当然製造工程中に求められると考えていますが、まだ認可された方法がなく開発中であると思います。

池田：赤血球への固定法には多分ホルムアルデヒド固定が採用されていたと思いますので、もう少し保存期間の延長が期待できると思います。ただウイルス不活化の問題はあまり考えたことがなかったのですが、そういう問題があることは知っておかなければなりませんね。

■3.3. リポソームの導入

池田：担体に赤血球を用いない方法もあります。1993年RybalkaらはPlateletsomeという、リポソームを担体とした血小板代替物を発表しました。これはdeoxycholateで可溶化した血小板膜タンパクをリポソームに移行させたもので、タンパクとしてGPIb, GPIIb/IIIa, GPIVを含め15種類以上の膜タンパクが含まれていることが証明されています。in vivoの系で実際機能するかどうか検討されていますが、放射線照射で血小板減少に陥ったラットや遺伝的にstorage pool deficiencyで血小板機能異常を呈するラットに輸注すると、尾切後の出血量が減少したことが示されました。

また1995年Yenらはヒトアルブミンをクロスリンクし直径約1.2μmに作成した粒子にヒトフィブリノーゲンを共有結合でコーティングしたThrombosphereを発表しました。in vitro, in vivoの検討で機能を有することが示されています。

池淵：リポソームというと、先生の研究室で開発中の血小板代替物にそろそろ話を移させていただいても宜しいでしょうか。

池田：ここ数年私たちは遺伝子組換え技術で作製したリコンビナントGPIbaをリポソームに導入する系の開発に努めています。CHO細胞にヒトGPIba-302をコードするcDNAを導入し、得られたrGPIbaをトロンビンアフィニティカラムで精製します。N-glutaryl-phosphatidyl ethanolamine (NGPE)を用いて卵黄レシチン：コレステロール：フォスマチジルグリセロール(モル比10:5:2)で構成されるリポソームにこれを導入したものです。抗ヒトGPIba抗体を用いてフローサイトメトリーで検討したところ、rGPIbaがリポソーム表面に固定されていることが明らかになりました。凝集能を調べるために、リポソームの平均サイズが330nmと小さいため、通常の凝集計ではなく散乱光を用いた凝集計が必要ですが、それで検討してみるとrGPIbaとそのリガンドであるvWFだけでは凝集はしませんが、そこにリストセチンを共存させると見事に凝集が惹起されることが分かりました。ローダミンで標識したリポソームを用いて、形成した血小板凝集塊の中にこのrGPIbaが取り込まれるかを検討したところ、きれいに凝集塊が赤く染まりました。リストセチンを添加するとvWFが血管内皮下組織に固相化されたvWF様に構造変化するとされているので、このrGPIbaリポソームは血液中では凝集せず、血管傷害部位で内皮下組織が露出した所だけで凝集に参画するという特徴を保持していると予想されます。

池淵：先生が血小板代替物に求められる調節機構、すなわち血液中では血栓をやたらに造らない、出血部位でのみ機能する、という課題がクリアーできたわけですね。

池田：そのように思っています。

池淵：生物製剤を材料に利用しない点が徹底され、他の血小板代替物がクリアーしなければならない点がすでに解決できているのはすばらしいですね。ところで動物モデルを用いたin vivoの評価系では成績はいかがですか。

池田：現在検討を開始したところで、まだまとまったお話はできません。

■3.4. 血小板凍結乾燥、膜成分の利用

池淵：あと血小板代替物開発には、献血由来の血小板製剤のうち期限切れで使用できなかった製剤を特殊な凍結・乾燥技術で機能を保持したまま保存する方法、同様の血小板から膜成分を回収し、小さな粒子状に再構成して用いる方法などが考えられていると聞いていますが、そのあたりの開発状況はいかがでしょうか。

池田：Infusible Platelet Membrane(IPM)と呼ばれる血小板膜を含むマイクロパーティクルが開発され、in vivoでもその止血効果が確認されています。動物では出血時間の短縮がみら

れ、実際米国ではヒトを対象とした臨床試験が開始されていると聞いています。出血時間の短縮がみられるが、血栓を誘発する危険性はないと聞いています。生物製剤を利用するためウイルスの伝播のリスクが気になりますが、膜成分であるため加熱処理が可能で、6 log以上のウイルス不活化工程が組み込まれているようです。注目すべき点としてこの膜成分には血小板糖タンパクのGPIbが存在しますが、他の糖タンパクはELISA法では証明されず、何らかの構造変化をきたしているようです。また心配される抗原性、特にHLA抗原は消去されているようで、この点は問題にしなくてよいと聞いています。

ただわたしが思うに、当然効果は一過性ではないでしょうか。

池淵：私の所属している血液センターのモットーの一つに、需要に見合った採血という考えがあります。献血を無駄にしないことがドナーへの感謝として当然必要です。必要以上に採血しないことが血液センターで徹底されれば、原則的には原料となる期限切れ血小板の確保は難しいの



池淵研二先生

ではないでしょうか。献血された血液が全て輸血に使用されるかというと、必ずしもそうではなく、検査落ち、外観落ちの血液は残念ながら一定の比率で出現します。しかしこうした輸血製剤として製造する以前に落ちたものを、材料に用いてよいかどうか、現在の血液行政の状況からみて、それはないと考えられます。例えば血漿分画製剤としてアルブミンや凝固因子を血漿分画センターで製造していますが、その製造工程にウイルス不活化が組み込まれていても、その材料の血漿には輸血に使用できるための厳しい基準をクリアしていることが義務づけられています。その血漿のドナーが後でウイルス感染のウインドウピリオドであったとか、なんらかの事情が発生した場合は、それが混ざった製品の回収が行われます。そう考えると、検査落ちして廃棄される血小板を材料にすることはできないと考えられます。アイデアとしてはあるが、その材料の確保が難しいことが予想されます。

池田：確かに献血事業を考えると、無駄をださないのが原則ですね。やはり人工物でその殆どを作製するタイプのものにメリットがありますね。

■3.5. 細胞培養の応用

池淵：実はわたしの経験から、血小板代替物を考えた場合、細胞培養の技術をそれに応用できないか、と考えているわけです。培養フラスコの中の細胞の増殖を顕微鏡で観察すると、未分化な造血の元になる細胞はすばらしい増殖力を有し、また環境を整えると種々の分化した血球系を产生できるのです。人工物で代用していくという方針に完全に反するわけで、あまり声を大きくしてしゃべれませんが、既に検討が進んでいる系を模倣したくないという気持ちもあり、少し考えています。

池田：実用面を強調することも大切ですが、血小板機能の大部分を補うことは人工物ではまず不可能で、目標が全ての血小板機能を有した代替物となると、細胞由来のものも候補に出てくるのではないかでしょうか。どのタイプの血小板代替物をどのような適応で利用するか、その問題に絡んでくると思います。

池淵：今ある企業と細胞の大量培養系の開発研究を行っています。ラジアルフロー型バイオリアクターと言って、1mLの中におよそ 10^8 個レベルの細胞が高密度培養できます。これまで私が培養フラスコで見てきた系に比べ、100倍から1000倍高密度なのでまずびっくりしていますが、同時にこれだけ造血系を制御できるサイトカインが利用できるような時代になると、一つは造血幹細胞、前駆細胞の大量増幅、もう一つは成熟血球の大量培養も試みられるのではないか、と思い始めてしまいます。ただ培養された細胞を本人に戻すのはまだ簡単でしょうが、献血血液と同じように広く他人にも利用してもらおうとするためには、生物製剤の持つデメリットも十分考慮しておかなければならぬ、と考えるようになりました。

■4. 血小板輸血全般

池淵：今年7月に私のセンターが主催して第9回北海道輸血シンポジウムを開催させていただきました。そのシンポジウムには先生にも講演をお願いしましたが、その際私も「トロンボポエチンと血液事業」という題で発表させていただきました。トロンボポエチンが開発された時は、このサイトカインが臨床に利用できるようになると、血液センターが製造している血小板製剤のかなりの部分が必要なくなるのではないか、およそ3分の1、あるいは約半分は必要なくなるという声も聞かれました。その後トロンボポエチンがマウスやヒビ等の実験動物では、放射線や抗ガン剤投与後の血小板回復を促進する、あるいは血小板ナディアーカーを高め血小板輸血が不要

になる、等の成績が矢継ぎ早に報告されました。しかし最近ヒトの臨床試験の成績がまとめて報告されず、またあまりヒトでは効かないらしい、という噂が流れ、今回発表前はどんな内容の話にするか、準備が大変でした。

そこで内容を血液センターの立場から考え、現在の血小板輸血がどんな症例にどれぐらいの比率で行われているか、どのような症例に実施されている血小板輸血がトロンボポエチンにより影響を受けるか、少し検討してみました。化学療法や細胞移植患者にはセンター供給分の約28%が供給されており、その約半分がトロンボポエチンの応用で不必要になるのではないか、とあくまで予想に基づき解釈を試みました。

その際、かつて輸血部の医師として働いた時から感じていたことですが、血液内科の臨床では移植後再発した患者、骨髄荒廃に陥った患者には約25%分が供給されていること、1ヶ月400単位以上輸血に依存している症例もあること、などをコメントに加えました。血液臨床の場でターミナルステージと思われる症例に大量の血小板製剤が輸血されていることに、少し抵抗を感じており、だからどう対処すべきか、はっきり言えないで困っていますが、先生、そのあたり御意見ございませんか。

池田：難しい問題ですね。臨床の先生に、慢性の血小板減少では臨床症状を診ながら血小板数が5千でも1万でも輸血せずに様子を見るのが良い、と言っても、その臨床医がかつて血小板数が2万で脳出血を起こした症例を経験したことがあれば、どうしてもその臨床医は血小板輸血をしてその状況を切り抜けたくなるものです。血小板輸血は予防投与ですから、いろいろな臨床例で各種の合併症を有している場合、自然に出血を開始する血小板レベルはいくつか、を決めるのは大変難しく、どうしても経験則に頼ってしまうわけです。血管のintegrityを維持するには最低血小板はいくつないといけないか、重要なテーマだと思っていますが、どのように解明していくべきか、苦

労します。日本では血液センターの活躍のおかげで、臨床医が求める血小板製剤は殆ど供給されていますので、使われすぎといえばそういう環境はあろうかと思います。ターミナルステージという言葉をあえて使うならば、血液疾患領域ではターミナルステージといつても、全く治療するのが無駄であるようなものばかりでなく、単に治療が難しくなっただけのものもあり、予想外に治療が奏効する症例が存在しうることから、他の領域で言われているターミナルステージとは異なり、治療を中断することはできません。

池淵：臨床にいる頃は、血小板輸血が患者の生命を維持できると考え、どんどん血小板製剤をオーダーしていました。ついで輸血部の医師として働くようになってから、血液製剤の後ろにドナーの方の顔が浮かぶようになり、血液製剤は注射薬と違い、どんどん工場で大量生産できるものではないから、できるだけ有効に使って欲しいと思うようになりました。今度センターに移ってからはますますそのように感じています。

池田：私も血小板代替物の開発ばかりでなく、血小板輸血臨床のかかえている課題を一つ一つ解決していくよう今後も協力したいと思っています。

池淵：今日はいろいろ教えていただき大変ありがとうございました。今回の座談会の内容を人工血液の紙面で発表させていただき、血小板代替物研究を進めておられる研究者の方々の参考にさせていただきたいと思っております。厚生省の高度先端医療研究事業が人工赤血球、血小板代替物、人工免疫グロブリン研究に対し、大がかりなサポートを開拓するというニュースもあり、これから開拓研究に拍車がかかるところですね。先生の研究がますます発展されますことを祈り、今日の対談を終了させていただきます。

人工骨髓の確立

平敏夫, 大野詩子, 三好康弘, 磯田由美,
阿部雅美, 中根麻子, 星淡子

Establishment of Artificial Bone Marrow

Toshio Taira, Utako Ohno, Yasuhiro Miyoshi, Yumi Isoda,
Masami Abe, Asako Nakane, Hiroko Hoshi

造血器官は、個体の発生において、当初は卵黄嚢中に現れ、胎児が発育する間に肝臓に移行し、出生後は骨髓に移る。さらに、生まれ間もない時期は、全身の骨髓で造血を行っているが、成熟、老化して行く過程で、手や足の骨の骨髓は脂肪に置き換わり造血能は失われ、造血を行っている場所は、頭蓋骨、胸骨、椎骨、肋骨、といった体の中心部のみになる¹⁻³⁾。本研究の目的は生体内で起こっている造血器官の発生、成熟、老化を理解し、in vitroにおいて造血器官を再現することにある。in vivoにおいて、もともと骨ではないところに実験的に造血の場をつくることができる。ラットの背部皮下筋膜上部に架橋したコラーゲンゲルをインプラントすると、軟骨形成、骨形成を経て、造血組織を形成する。牛骨由来bone morphogenetic protein(BMP)活性画分はこの骨形成を早める。一方、牛皮質骨骨粉より非コラーゲン性マトリックス蛋白成分としてBone Proteoglycan(PG), α2-HS-Glycoprotein(α2-HS), Bone-Sialoprotein(BSP), Osteonectin(ON), Osteocalcin(OC)それぞれ精製し、脂肪前駆細胞培養系に加えると、皮質骨蛋白成分中のON, PG, α2-HS, が強く脂肪細胞への分化を抑制した。BSPは逆に脂肪細胞分化を促進した。これらの結果から皮質骨中には造血の場を作る、また維持する為に有利に働く物質が存在すると予想される。

Pluripotential stem cells first appear in the yolk sac in embryogenesis. Later on, the fetal liver becomes hematopoietic organ and stem cells are found as well. Following birth, the bone marrow is the major source of hematopoietic stem cells. All of bone marrow produces blood cells at the newborn age. As the growth goes on, hematopoietic active area decreases gradually, and the bone marrow of the extremities changes into adipose tissue. The aim of this study is the establishment of artificial bone marrow in vitro. It is possible to induce the ectopic bone with marrow at the non-bony tissue. Crosslinked collagen gel induced hematopoietic organ followed by chondrogenesis and osteogenesis by implantation subcutaneously into back skin of rats. Bone morphogenetic protein(BMP) purified from bovine bone enhanced this osteogenesis. On the other hand, when the mineralized bone matrix protein, collagen(CO), bone proteoglycan(PG), α2-HS-glycoprotein(α2-HS), bone-sialoprotein(BSP), osteonectin(ON), osteocalcin(OC), purified from bovine bone were added to pre-adipocyte, PG, α2-HS and ON strongly inhibited the differentiation into adipocyte. BSP enhanced the differentiation. These data suggest that mineralized bone might contain several kinds of factors to control the hematopoietic activity in the bone marrow.—Key words: Artificial bone marrow, Hematopoietic organ, Osteogenesis, Adipogenesis, BMP, Bone matrix protein.

1. はじめに

これまでの造血に関する研究は、造血系の細胞に働くサイトカイン、増殖因子の発見、開発培養系確立により飛躍的な発展を遂げてきた。

しかしながら、今もって培養系のみで造血系幹細胞(hematopoietic stem cell)を、幹細胞としての機能を保持したまま増殖させ、目的とする細胞系に分化誘導させることは確立されて

いない。

我々は、ラットを用いた異所性の骨誘導実験系を用い、造血組織形成のメカニズムの把握、及び本実験より得られた結果からin vitroにおいて造血の場を再現することを目的として実験を進めた。

さらに、石灰化骨に蓄積されている物質、特に、マトリックス蛋白に注目して、非コラーゲン性蛋白質を中心に、これらの蛋白が造血器官(骨髓)の維持、特に今回、骨髓の脂肪化の抑制という点について未分化間葉系細胞の脂肪細胞への分化に対する影響を調べた。

(株)サンギ北海道研究所, 〒047-02 小樽市星野町250-11, Hokkaido Research and Development Center Sangi Co Ltd, 250-11 Hoshino-cho, Otaru 047-02, Japan.

論文受付97年9月5日、受理97年9月25日。

2. 方法

2.1. 異所性骨誘導系の確立

牛真皮よりペプシン可溶化コラーゲンを通常の方法を用い精製し、1%塩酸酸性溶液を調製し、さらにこの溶液を生理的な条件、即ち150mM NaCl, 20mM Na₂HPO₄ の条件としコラーゲンを線維化させコラーゲンゲルを作成した。このゲルをヘキサメチレンイソシアネート(HMDIC)を用い架橋し、ラットの背部皮下に18週間インプラントし骨形成及び、骨髄形成を組織学的に見た。

また、骨形成の速度を速める目的で、下記に示す方法で部分精製したBMP活性画分(BMPカクテル)を、グアニジン塩酸抽出残差(IBC):乾燥重量20mgに含浸させ(BMP含浸ペレット)，同様にラットの背部皮下にインプラントし2週間後に取り出し骨形成の有無を軟X線写真撮影、カルシウム沈着量、アルカリフォスフォターゼ活性(ALP活性)を測定することにより調べた。ALP活性の測定は、インプラント後のBMP含浸ペレットを抽出溶液1mLで抽出し、この抽出溶液中のALP活性をヤトロン社製アルカリ性ホスファターゼ測定試薬Sを用いて測定した。

2.2 牛骨由来BMP活性画分の部分精製

牛骨粉1kgを塩酸脱灰後、4Mグアニジン塩酸により非コラーゲン性蛋白質を抽出し、抽出液中のBMP活性画分をKobayashi⁴らの方法(ハイドロキシアバタイトカラム、ヘパリンカラム、S-300ゲル濾過カラムの3段階のカラムにより精製)に準じて部分精製し、最終精製物15mgを得た。

最終精製物BMP活性画分中のBMPの確認は、市販の抗BMP-2モノクローナル抗体を用いウェスタンプロット法によって確認した。また、BMPの活性は、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1の培養系に加え活性測定を行った⁵。

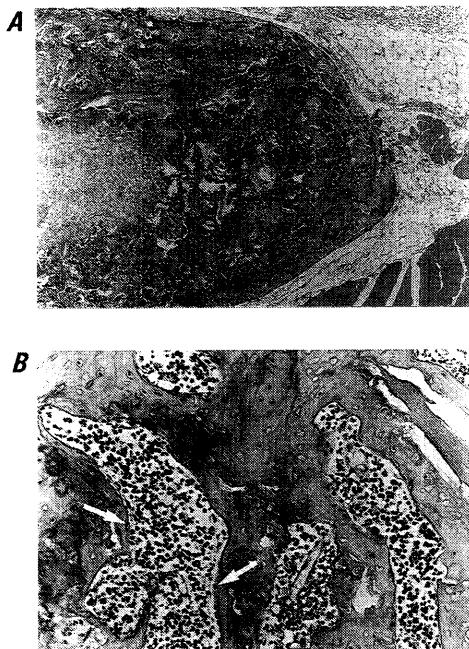


Fig.1. Hematoxylin Eosin staining of HMDIC crosslinked collagen gel implanted subcutaneously into back skin of rats for 18 weeks.

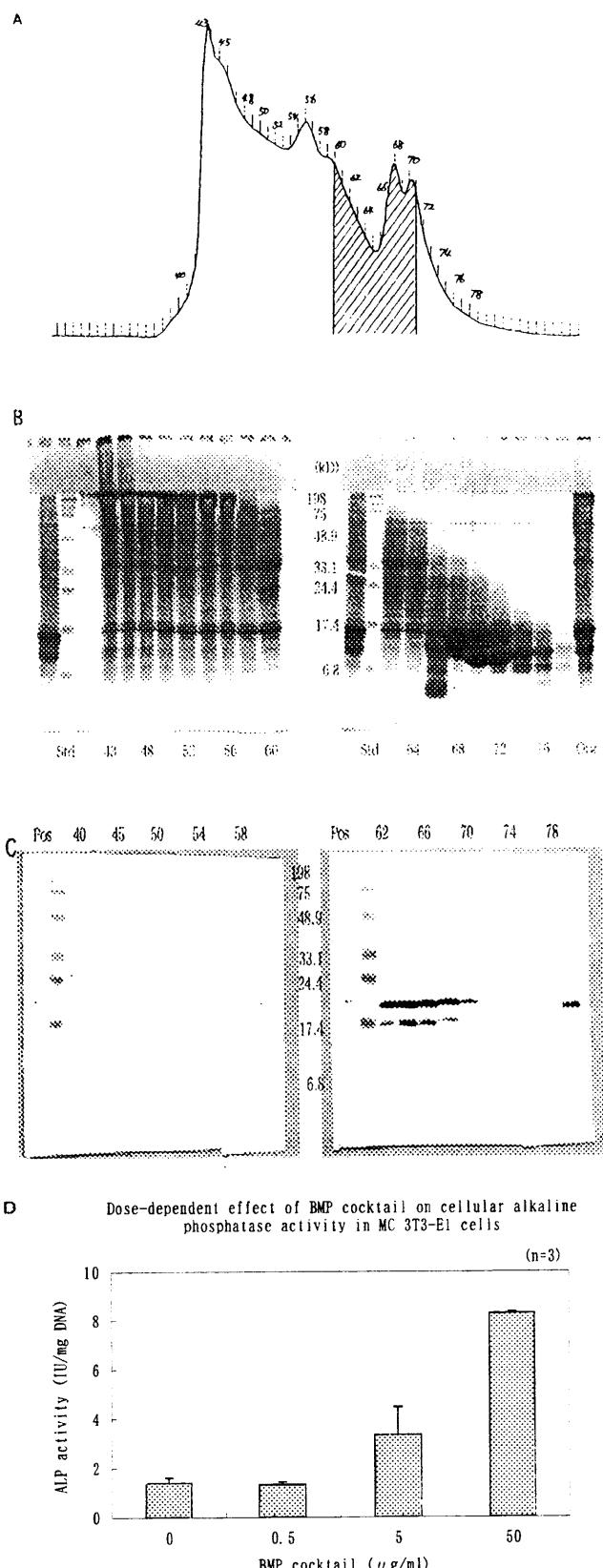


Fig. 2. Purification of BMP Cocktail on a S-300 GPC.

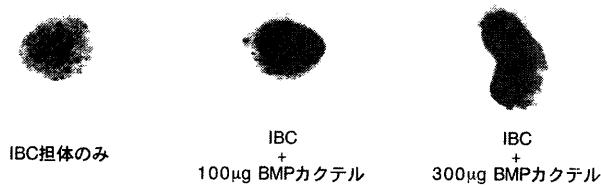
A: Fractionation of proteins, B:CBB Staining,

C:Western blotting, D:in vitro osteogenic activity.

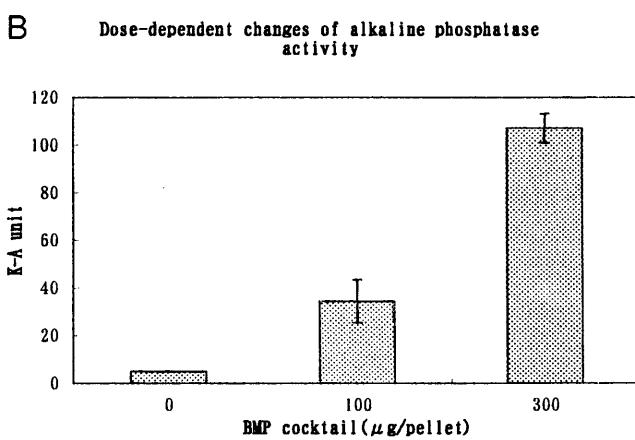
2.3 皮質骨中の脂肪細胞分化抑制活性物質の探求

上記骨粉からの塩酸脱灰液中、及び塩酸グアニジン抽出物中から上記非コラーゲン性蛋白質を精製し $0.45\mu\text{m}$ メンブランフィルター除菌後、脂肪前駆細胞3T3-L1に、0, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の間で濃度を変えて加えた。培養は3T3-L1細胞を24穴プレートでconfluentになるまで培養し、0.25 μM dexamethazon, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulinにより脂肪細胞へ分化を誘導し、1日培養後各サンプルを添加し5日後細胞を回収し、脂肪細胞の分化のマーカーとしてグリセロール3磷酸脱水酵素(GPDH)活性を測定した。

A



B



C

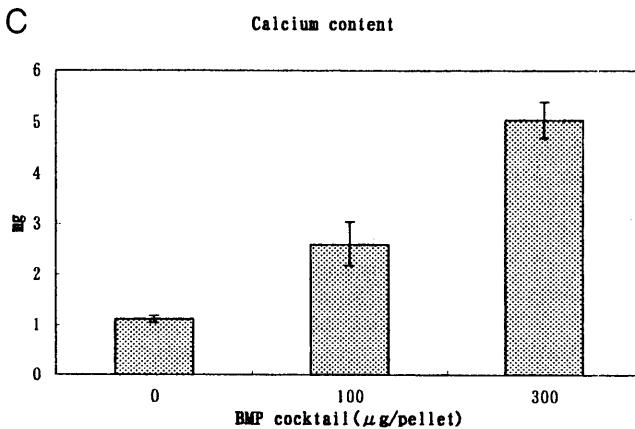


Fig. 3. In vivo osteogenic activity of BMP cocktail.

A:soft X ray analyses, B:ALP activity, C:calcium content.

3. 結果

架橋したコラーゲンゲルをラット背部皮下、筋膜上に18週間インプラントした場合の組織切片ヘマトキシリノーエオジン(HE)染色像をFig.1に示した。Fig.1からわかるように、本来骨ではない組織、皮下筋膜上部において、明らかに骨化(Fig.1A)が起こり、しかも造血能を有する骨髓(Fig.1B)が作られている。Bone marrow stroma細胞(洞周囲外膜細胞)に囲まれた造血微少空間内部で造血が行われていることがわかる(Fig.1B 矢印部分)。

骨組織以外でより早く骨形成を起こさせるファクターとしてBMPが知られている。牛骨より部分精製したBMPカクテルの最終精製:S-300ゲル濾過カラム精製時におけるクロマトパターンをFig.2A, CBB染色像をFig.2B, ウエスタンプロッティングの結果をFig.2Cに示した。ゲル濾過クロマトパターン中のfr60からfr70までをプールし最終生成物として以下の実験に用いた。活性検定のために行った、MC3T3-E1細胞のALP活性測定の結果をFig.2Dに示した。結果は、培養皿中の全細胞を回収し細胞層のALP活性を測定し、培養皿当たりのDNAを測定しノーマライズした。濃度依存的にALP活性が上昇している結果が得られた。BMPカクテルをグアニジン抽出残差に加え、ラット背部皮下にインプラントし、2週間後の骨形成能を示す軟X線撮影像をFig.3A, ALP活性をFig.3B, カルシウム量をFig.3Cに示した。

牛皮質骨中に存在する各種骨基質蛋白質の脂肪細胞分化抑制活性を調べた結果をFig.4に示した。この図からわかるように、今回調べた骨基質蛋白質の中でPG, α 2-HS, ON, が強く脂肪細胞への分化を阻害したが、collagen peptide(CP), OCには阻害効果は見られなかった。BSPは逆に脂肪細胞への分化を促進した。

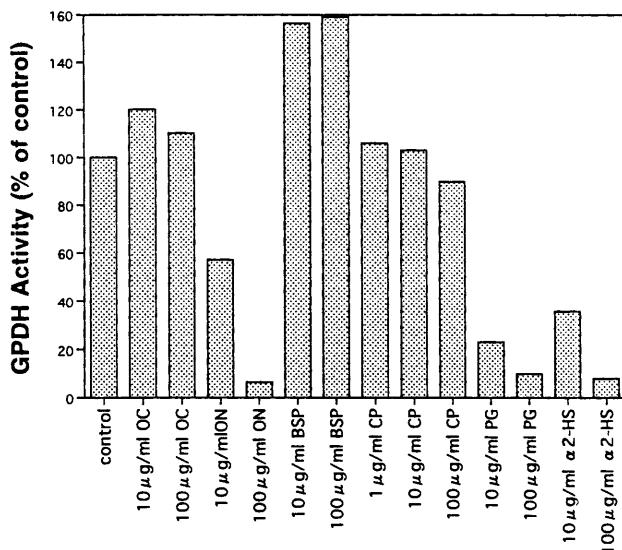


Fig.4. Inhibitory effect of bone matrix proteins on adipogenesis.

4. 考察

生体内において最終的に造血の場は骨髓に移行し生涯血球を作りつづける。何故発生のある時期に骨髓に移行してくるのかはまだわかっていない。骨という特殊な臓器に造血の場としての条件

が備わっているからと推測される。発生時期の骨形成を見ると、軟骨形成から石灰化骨に移行し、この後ある決まった位置から血管の進入が起こり造血組織は骨の中心部のみとなる。今回行ったような異所性骨形成実験系においても同様に、インプラントした物の中心部に造血組織が出来る。

我々は、*in vitro*において造血の場を再現することを目的に研究を進めている。異所性骨誘導の実験系から、「何が造血の場として必要なのか」を知ることが可能であると考えている。残念ながら今回の実験では、BMPカクテルによって骨髄形成の段階まで違うことが出来なかつたが、2週間のインプラントにより骨形成までは起こっていることから骨髄形成はこの後、起こってくるものと考え、今後インプラントの期間を延長した実験を計画している。

他の研究者の結果でポーラスなハイドロキシアパタイト焼結体のみを皮下にインプラントし造血組織が形成されたとの報告もあり、また異所性骨誘導の結果も考慮して考えると、リン酸カルシウムの沈着もその要因の一つであると考察される。また、骨基質の中にはBMPをはじめ、TGF-β、IGF、等各種サイトカインその他骨特異的蛋白が直接もしくは、stroma細胞を介して間接的に造血幹細胞に働きかけ、その自己複製、及び分化の方向性に影響を及ぼしているものと考えている。

また、個体が成熟した後の造血組織の維持と言う観点から、stroma細胞の脂肪細胞への分化を抑制する作用がある物質を皮質骨基質蛋白質中に求め実験を進めてきたが、これまで報告されてきた、TGF-β、BMPなどのサイトカインのみならず、基質蛋白質であるONやα2-HS、PGが強力に脂肪細胞への分化を抑制することが今回の実験でわかった。おそらく、骨基質中に蓄えられているサイトカイン群、非コラーゲン性のmatrix protein等がstroma細

胞の脂肪細胞へ分化してしまうのを抑え、いわゆる脂肪髄に陥ることから免れていると考察される。しかしながら、長管骨の多くが生理的に正常な状態で脂肪髄になること、及びBrookoffらが言うように脂肪細胞がgranulocyteの増殖を支えているとの考え方もあり、脂肪髄の量はある意味では造血組織の量的、及び質的コントロールとして働いているのかもしれない^{6,7)}。

以上のような結果を踏まえ、今後造血の場を*in vitro*で再現することを最終目的として実験を重ねてゆきたい。

参考文献

1. Gimbel JM, et al. The function of adipocytes in the bone marrow stroma:an update. Elsevier Bone 1996;19:412-26.
2. Tavassoli M, et al. Bone marrow histogenesis:A comparison of fatty and red marrow. Science 1970;169:291-3.
3. Tavassoli M, et al. Fatty involution of marrow and the role of adipose tissue in hematopoiesis. Nj Humana 1989;4:157-87.
4. Kobayashi D, et al. Time-dependent expression of bone sialoprotein fragments in osteogenesis induced by bone morphogenetic protein. J Biochem 1996;119:475-81.
5. Takuwa Y, et al. Bone Morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. Bioch Bioph Res Commun 1991;174:96-101.
6. Brookoff D, et al. Adipocyte development and the loss of erythropoietic capacity in the bone marrow of mice after sustained hypertransfusion. Blood 1982;60:1337-44.
7. Hashimoto Y et al. Effect of BMP on the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts in a collagen-gel culture. Jpn J Oral Biol 1995;37:130-43.

原著

ヒト由来肝癌細胞を用いたラジアルフロー型バイオリアクターによるアルブミン大量産生

蓮村 哲¹⁾, 松浦知和¹⁾, 相崎英樹²⁾, 川田雅昭³⁾,
清水英佑³⁾, 水谷悟⁴⁾, 永森静志¹⁾

A Fine Performance of Albumin Production of Human Liver Cancer Cell Lines Using a Radial Flow Bioreactor

Satoshi Hasumura¹⁾, Tomokazu Matsuura¹⁾, Hideki Aizaki²⁾, Masaaki Kawada³⁾,
Hidesuke Shimizu³⁾, Satoru Mizutani⁴⁾, Seishi Nagamori¹⁾

肝特異蛋白の大量生産を目的として、樹立ヒト肝癌細胞株(human liver cancer cell lines)を用い、アルブミン(albumin), AFP(alpha-fetoprotein)産生量を単層(monolayer culture)と三次元培養(three dimensional culture)系で測定し、培養法の違いによる影響を検討した。高密度三次元培養が可能なラジアルフロー型バイオフローのアルブミンを指標とした肝特異蛋白大量培養系システムの確立を探った。この培養システムでは、単層培養と比較して、アルブミン産生は6.9倍に増加し、AFP産生は400分の1に減少した。これらの結果より、従来のフラスコでの単層培養と比較し、当システムでは生体内により近似した三次元培養が可能となり、肝細胞が本来持つ機能を発揮できる点で有用であると考えられた。

The present study was designed to establish a mass culture system for liver-specific proteins in a radial flow bioreactor, which allows high density and three dimensional cultures. We examined the effects of monolayer and three-dimensional culture systems of human liver cancer cell lines on albumin and alpha-fetoprotein production levels. Albumin production was 6.9 times greater and alpha-fetoprotein production decreased to 1/400 than with the monolayer flask culture when the mass culture system was used. These findings showed that the mass culture system allows three-dimensional cultures that are closer to *in vivo* conditions than the conventional monolayer flask cultures and that it is helpful in expressing functions originally present in liver cells.—Key words:Albumin, Human liver cancer cell lines, Radial flow bioreactor, High density culture, Three-dimensional culture.

1. はじめに

アルブミンやAFPは肝特異蛋白として代表的蛋白であるが、アルブミンは成人の血漿蛋白の約半分を占め、血漿浸透圧の保持、脂質の輸送、薬物代謝などの生命維持に最も重要な蛋白の一つである。一方AFPは主に肝細胞で産生される蛋白で、胎生期に発現し生誕を機にアルブミン産生に置換される。アルブミンとAFPの発現に関する制御機構を探求することは、肝特異蛋白の産生機構を解明するため重要である。肝不全でのアルブミン産生低下や腎不全時の漏出は、全身浮腫をきたすばかりでなく、循環器系に負担をかけ、さらにはホルモンや電解質へも影響を及ぼす^{1,2)}。

また我々は従来よりヒト肝癌細胞株の樹立を試み³⁾、現在6株の

肝癌由来細胞株を有している⁴⁾。このうちFLC-4,7株は、アルブミン・AFPを産生することを明らかにし、そのアルブミンの、ヒト血清アルブミンとの異同を検討した。Ouchterlony法、Immuno-precipitation法、Westernblotting法により免疫学的にも、生化学的にも、まったく同一の性状を示すことを確認している^{5,7)}。一方水谷ら(キリンビール(株)基盤技術研究所)により新たに開発されたラジアルフロー型バイオリアクター^{8,9)}は、従来のフォローファイバー型リアクターに比べ、細胞は三次元的に配列し細胞本来の機能を良好に発現することが示されている。本研究で使用する細胞株でもアルブミン産生が著増することを報告している^{10,11)}。以上よりヒト肝由来細胞株はアルブミン、AFPの産生調節機構を有し

1) 東京慈恵会医科大学内科学講座第一, Internal Medicine (), Jikei University School of Medicine, 2) 東京慈恵会医科大学環境保健医学教室, Department of Public Health and Environmental Medicine, Jikei University School of Medicine, 3) 国立感染症研究所, National Institute of Infectious Disease, 4) キリンビール基盤技術研究所, Central Laboratories for Key Technology, Kirin Brewery Co., Ltd.

東京慈恵会医科大学内科学講座第一, 〒105 東京都港区西新橋3-25-8, Internal Medicine (), Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan.

論文受付97年8月4日、受理97年8月29日。

ており、肝特異蛋白の產生制御機構の解明に有用な細胞株であり、元来蛋白產生能も高くラジアルフロー型バイオリアクターとの組み合わせは大量蛋白產生系として期待できる¹²⁾。

各ヒト肝由来細胞を用いて、細胞生物学的差異での蛋白產生量を比較検討することはアルブミン、AFPの発現調節を明らかにするため有意義であり、肝の発生に伴う肝細胞の分化や癌化の機構の解明のために貴重な知見となる^{13,14)}。一般的には単一の株細胞を用いてアルブミンやAFPの產生調節からの検討が行われているが、この研究では肝特異蛋白の產生量が異なる細胞株でどのように変化するかを調べることにより、三次元培養下では肝機能のより高次の発現を検討した。これらの検討は、生体の蛋白生産工場としての肝臓機能をリアクター内で再現し、新しい蛋白大量生産システムとしての基盤作りという側面も有する。

アルブミンとAFPのアミノ酸配列の基本構造の類似性により、両遺伝子の起源が同じであり、両遺伝子が同じchromosome上にコードされていることが分かっている。また、胎児から新生児に至る段階でAFPとアルブミンのmRNAのレベルは変化することが知られている。また、両蛋白の产生調節に、肝特異プロモーターやエンハンサーの活性化が関与し、これには肝特異核内転写調節因子の関与があること、一方AFP产生を抑制するsilencer geneの存在が示唆され、またホルモンやビタミンの核リセプターへの結合も重要な要素と考えられ、具体的なバインディングサイトとしてはAFP遺伝子上流のグルコルチコイドとレチノイドに対するものが指摘されているが、調節機構の全体像は明らかではない。

また三次元培養という物理的条件による細胞機能に関する研究はスフェロイドを用いたものがあるが、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いることにより、より簡易に安定した三次元培養ができる。

動物細胞培養を用いた蛋白產生系としては、CHO細胞を用いたローラーボトルによる方法が一般的であるが、ラジアルフロー型バイオリアクターによるシステムは高密度コンパクトな高機能大量培養が可能であり、蛋白產生に要するコストの低減に有効と考えられる。さらにヒト由来細胞を使用することにより、夾雜蛋白もヒト由来蛋白であり、このシステムにより製造される生理活性蛋白は免疫学的に安全性が高い物となると予想される。

2. 方法

2.1. 樹立ヒト肝細胞株

FLC-4細胞⁵⁾

由来症例は51歳男性。手術により得た肝細胞癌試料より樹立。ディスペーザ処理をし、培養樹立した肝細胞癌株。

株細胞の性質：位相差顕微鏡下で上皮様形態を呈し、電顕的には、ER、リボゾーム、ミトコンドリア、ゴルジ等の細胞内小器官を認め、細胞間には毛細胆管構造を認める。アルブミン、AFPほか多種蛋白も分泌している。倍加時間は55時間。chromosome numberは75と79。

HBV-DNAのintegration、HCV-RNAはない。

FLC-7細胞^{7,15)}

53歳男性の肝硬変に合併した肝細胞癌患者の手術材料より樹立。0.25%トリプシンを浸したろ紙を用い釣り上げ法でクローン分離を行った。

株細胞の性質：形態学的に敷石状配列を示す上皮様細胞。HBV-DNA integrationについてはHindⅢ処理で6.0と2.5kbの位置に、2本のバンドを認めるが、virusの発現はない。HCV-RNAは認めない。

2.2. ラジアルフロー型バイオリアクター(Fig.1)

研究に用いたラジアルフロー型バイオリアクター(RA-400, Biott, 東京)は、付着依存性動物細胞の高密度大量培養を目的として開発された、全く新しい充填層型バイオリアクターである。この装置の特徴は次の通りである。1)三次元構造を有する担体を用いることにより、グルコース消費量より積算した細胞密度が、 $1 \times 10^8 \text{ cells/mL-matrix}$ という高密度培養を可能とする。2)培養液を円筒形の充填槽の外側面から円中心軸に向かい、放射状(ラジアル)に供給することにより、栄養、酸素の細胞への供給が均一となり、スケールアップも可能となった。現在、容量5Lまで実用化されているが、理論的には数十Lまでスケールアップできる。

3)培養装置(Fig.2)は37°Cの恒温槽内に置かれ、おもにラジアルフロー型バイオリアクター[1]と培地制御槽[2]で構成されてい

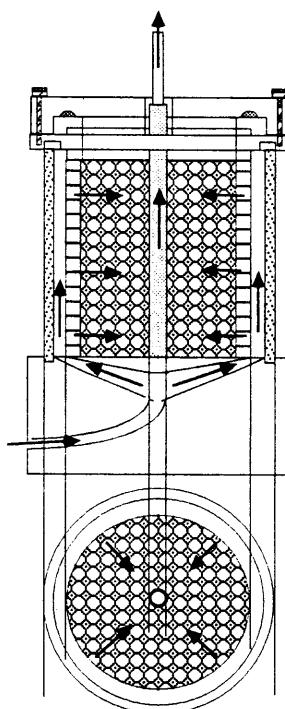


Fig.1 Radial Flow Bioreactor Column
→medium flow

The radial flow bioreactor solved problems of the conventional hollow fiber bioreactor, such as

- 1) concentration gradient of nutrients and oxygen,
- 2) deviation of metabolites,
- 3) influence of shear stress according to the medium flow rate and its viscosity
- 4) cell precipitations due to gravities
- 5) incomplete three dimensional culture by feeding the medium radially to the matrix bed in a cylindrical shape. Using spherical porous glass beads.

る。これらに培養液供給用[3]と生産物回収用[4]のタンク、供給用、回収用、循環用の3つのポンプが接続され、アルカリの供給[5]もコンピューター[6]により自動制御されている。制御槽にはpH電極、温度センサー、溶存酸素電極、空気や酸素そして二酸化炭素の供給チューブが装備されている。气体はマスフローコントローラーで自動制御、混合されてからエアーフィルターを通して制御槽へ送られる。タンクの重量は電子天秤にて5分毎、溶存酸素濃度やpHは20分毎に自動測定される。リアクター本体は円筒形、担体の入る容積は200-400mLで、培養液は中心のメッシュ状の焼結金属フィルター(孔径40μm)より回収される。培地供給量は、一日のグルコース消費量(g/day)/酸素消費量(g/day)の比率に従いコンピューター制御されている。酸素消費量は制御槽内の溶存酸素濃度とリアクター出口の溶存酸素濃度により、両者の差に循環速度をかけて求められる。今回の培養時の培地供給量は1-10L/day、培地循環速度は50-200liter/dayである。今回の培養では、酸素供給量は50-400mL/min.が至適供給量であった。

4) 担体はシラン(Siran, Schott Glaswerke Co., Ltd, Germany)と呼

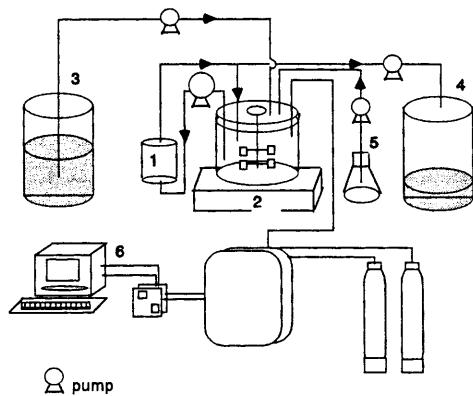


Fig. 2 Radial Flow Bioreactor System

Fresh medium[3] is fed to the conditioning vessel[2] by feeding pump. NaOH[5] is added to the vessel in decreasing of pH of medium. Conditioned medium circulates in a radial flow bioreactor [1] at the rate of 100 liter a day. Samples are taken to aliquots tank [4] by recovery pump. Solved oxygen, temperature, pH, feeding volume and circulation rate of the medium are checked every 20 minutes, which is controlled by microcomputer[6].

ばれ、球状の多孔質ガラスで、直径約0.6mm、内部は蜂巣状に孔が空いており、空隙率は50%、表面積は900cm²/mL-matrix。細胞はこの表面や内部に接着し、400mLのリアクター内では、1×10¹⁰cells以上の細胞数となる。

2.3. 培養液

ASF104(味の素(株)、東京)¹⁶⁾は無血清培養を目的として作られた培養液である。ヒト細胞の微量生理活性物質の精製、抽出のためには異種蛋白の除去が必要であり、無血清培地が有効である。また、オートクレーブを可能にするために、熱分解されやすいグルタミンをグリシンやアラニンでカッピングしたダイペプチドを500mg/Lづつ加えてある。

2.4. 培養細胞機能の測定

2.4.1. グルコース濃度の測定

回収された培養液中のグルコース濃度はsample 20μLをグルコース測定キット(グルコースCテストワコ、和光純薬)の溶液3mLに加え、spectrophotometer(UV-160A、島津製作所)で505nmにて測定。濃度に培地供給速度をかけて一日の消費量を算出した。

2.4.2. アルブミンとAFP(AFP)の測定法

共にEnzyme Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)法にて測定した。

3. 結果

3.1. FLC-7細胞における単層培養でのアルブミンとAFP濃度(Fig.3)

FLC-7のフラスコでの単層培養9日目の培養上清では、アルブミン濃度11mg/L、 AFP濃度24mg/Lとなり、培養期間中経時に採取した培養上清では、常にAFP産生優位であった。

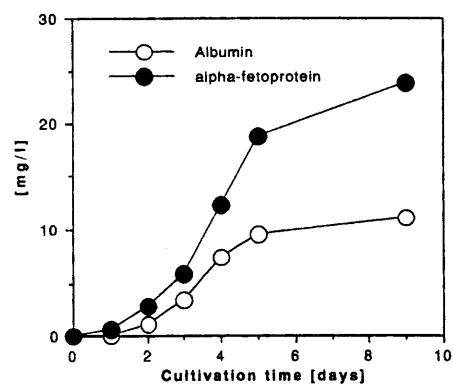


Fig. 3 Concentration of albumin and AFP level from FLC-7 cells in monolayer culture

3.2. FLC-7細胞における三次元培養でのアルブミンとAFP産生量(Fig.4)

400mL容量のバイオリアクターでのFLC-7細胞培養では、単層培養と異なり、培養経過中を通じてアルブミン産生はAFP産生の数倍の値を示した(Human Cell¹⁰)より引用)。

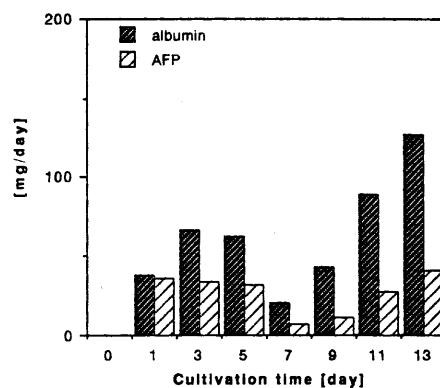


Fig. 4 Production of albumin and alpha-fetoprotein from FLC-7 cells in reactor culture

3.3. FLC-7細胞の三次元培養におけるグルコースと酸素消費量

(Fig.5)

FLC-7を400mL容量のラジアルフローで培養したところ、培養4日後には、グルコース消費量は6.8g/day、酸素消費量は3.0g/dayに達し、急激な細胞の活動性の上昇が認められた。

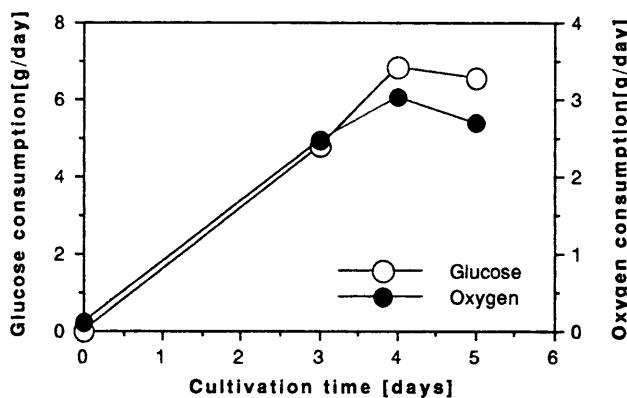


Fig. 5 Consumption of glucose and oxygen of FLC-7 cells in reactor culture

3.4. FLC-4細胞のアルブミン産生(Fig.6)

FLC-4の単層培養5日目の培養上清におけるアルブミン産生量は、 $159.8\mu\text{g}/24\text{h}/10^6\text{cells}$ であり、三次元培養されたラジアルフロー(200mL容量)では、培養40日目で $1100\mu\text{g}/24\text{h}/10^6\text{cells}$ と6.9倍の産生量を示した。

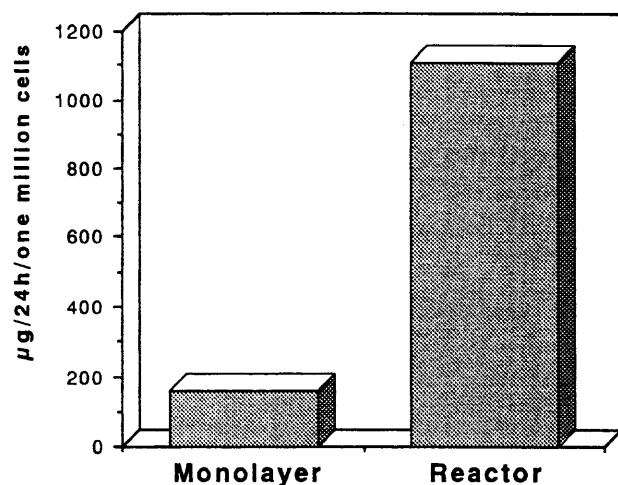


Fig. 6 Production of albumin from FLC-4 cells monolayer and reactor culture

3.5. FLC-4細胞のAFP産生(Fig.7)

FLC-4の単層培養でのAFP産生量は、培養5日目の上清で $190.8\text{ng}/24\text{h}/10^6\text{cells}$ 、200mL容量のラジアルフローでの培養では、培養40日目には $0.475\text{ng}/24\text{h}/10^6\text{cells}$ と単層培養の400分の1へ減少した。

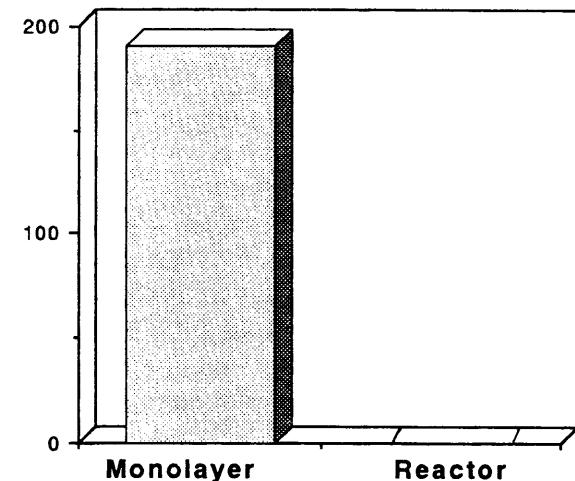


Fig. 7 Production of alpha-fetoprotein from FLC-4 monolayer and reactor culture

3.6. FLC-4細胞の三次元培養でのアルブミン、AFP濃度(Fig.8)

200mL容量のラジアルフロー型バイオリアクターでFLC-4細胞を高密度三次元培養した結果、40日にわたり細胞は活動性を維持し、培養液中のアルブミン濃度は、AFP濃度の約1000倍以上を示した(Lancet投稿中)。

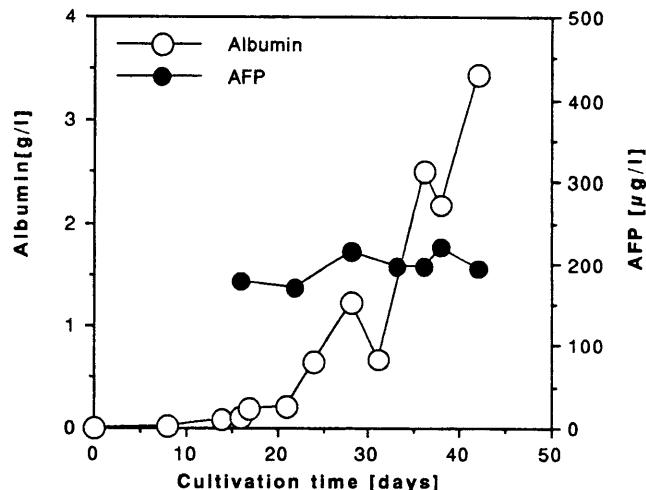


Fig. 8 Concentration of albumin and alpha-fetoprotein from FLC-4 cells in reactor

4. 考察

肝不全にたいする救命の期待値が高いものとなるにはいまだ多くの問題を有すると考える。ホローファイバーの使用により、装置の大型化が可能になり、また、スフェロイド培養による装置の開発は、肝細胞の特異機能を高めたが大量の肝細胞の培養には十分でなく、それらの点は解決されていないようである。

肝細胞は、本来、三次元的環境にあってはじめて高機能が發揮できること、その代謝が多様であり、壊死に陥りやすい、などの複雑な点が問題がある。

ラジアルフロー型バイオリアクターシステムは、先に述べたホローファイバーの問題点、すなわち、栄養、ガスの供給、阻害物

質除去の困難、培養液の流れの不均等、剪断力の影響受けやすく、細胞塊による不均等な液の流れ、また肝細胞にとって最も望ましい三次元培養が不可能という、問題点を解決することができたはじめてのリアクターである。

5. 結論

各肝由来細胞をラジアルフロー型バイオリアクターで培養した際の、アルブミン産生能やAFP産生能を蛋白レベルから測定し、二次元培養下と三次元培養下での肝特異機能発現状況の違いを比較した。三次元培養と単層培養におけるアルブミンと AFP 産生量の比較検討では、単層培養では一日当たりの産生量は AFP 優位であったが、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた三次元培養では、アルブミン優位へと変化していた。生体内に近似した条件の良い当システムでの培養にて、肝由来細胞本来の性質が發揮されたと考えられる。

また、臨床応用として、当システムを用いる場合には、充分に安全性の確認された細胞を使用する必要がある。

ここまでの中見を基礎に、今後、より肝特異蛋白産生に効率のよい発現条件を決定し、ラジアルフロー型バイオリアクターでアルブミンの大量産生を試みる予定である。当システムは、新しい肝特異物質生産システムとして有用と思われた。

謝辞

本研究の一部は文部省科学研究費(永森静志 No.09480257, 蓮村哲 No.09670578)の助成によるものである。

参考文献

1. 永森静志. 肝臓の機能と構造(2章)わかりやすい肝臓学－症例から学ぶ肝・胆道疾患の鑑別診断と治療. 沖田極, 荒川泰行編. 東京: 杏林書店, 1994;14-32.
2. Matuura T, Nagamori S, Hasumura S, Niiya M. Retinol Transport in Autoradiography. Experimental Cell Research 1993;206:111-8.
3. 永森静志, 蓮村哲, 松浦知和, 新谷稔. 消化器疾患におけるin vivoとin vitroの接点－肝細胞研究から臨床応用への道－, 原田尚編. 21世紀を目指し羽ばたく消化器病学. 東京: 日本医学館, 1993;414-8.
4. 永森静志. 各種がん細胞株の特性. 鈴木利光編. ヒトがん細胞株とその特性. 東京: 中外医学社 1992;190-8.
5. 蓮村哲, 筋野甫, 永森静志, 亀田治男. ヒト肝細胞癌由来細胞株JHH-4株の樹立とその性状. Human Cell 1988;1:98-100.
6. 永森静志, 藤瀬清隆, 蓮村哲, 本間定, 筋野甫. ヒト培養肝細胞の産生物質. Human Cell 1988;1:382-90.
7. 本間定, 永森静志, 藤瀬清隆, 蓮村哲, 筋野甫, 松浦知和. AFP, CEA 産生性ヒト肝癌細胞株JHH-7の樹立とその性状－特に温熱処理後におけるAFPとCEAの分泌動態の相違について－. Human Cell 1990;3:152-7.
8. 水谷悟. ラジアルフロー型バイオリアクター. 細胞培養 1992; 18:249-54.
9. Yoshida H, Mizutani S, Ikenaga H. Production of monoclonal antibodies with a radial-flow bioreactor. In: Kaminogawa S, ed. Animal Cell Technology Vol.5. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993;347-53.
10. 川田雅昭, 永森静志, 相崎英樹, 深谷憲一, 新谷稔, 清水恵一郎, 松浦知和, 筋野甫, 蓮村哲, 吉田均, 水谷悟, 池永裕. ヒト肝由来細胞を用いたバイオ人工肝補助装置の開発－ラジアルフロー型バイオリアクターを用いて－. Human Cell 1994;7:95-100.
11. Kawada M, Nagamori S, Aizaki H, Fukaya K, Niiya M, Matsuura T, Sujino H, Hasumura S, Yoshida H, Mizutani S, Ikenaga H. Massive Culture of Human Liver Cancer Cells in Newly Developed Radial Flow Bio-reactor System: Ultrafine Structure of Functionally-enhanced Hepatocarcinoma Cell Lines. In Vitro Cellular & Developmental Biology (In Press).
12. 永森静志. ヒト肝癌細胞の生物学的特異性とその応用－肝癌細胞の株化樹立からバイオ人工肝装置の利用まで－. 肝胆膵疾患研究の進歩 2. 東京: 国際医書出版, 1994;92-109.
13. 永森静志. バイオテクノロジー素材としてのヒト癌細胞(1); 胆囊癌 NOZ. 蛋白質・核酸・酵素 1988;33:2605-6.
14. Nagamori S, Hasumura S, Shimizu K, Niiya M. Relation Between Albumin-Positive Hepatocytes and Glutathione-S-Transferase-Positive Foci in Nagase Analbuminemic Rats Treated with 3'-Methyl-4-Diaminoazobenzene. Journal of Toxicologic Pathology 1992;5:39-46.
15. Fujise K, Nagamori S, Hasumura S, Niiya M. Integration of Hepatitis B Virus DNA into Cells of Six Established Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. Hepato-Gastroenterology 1990;5:439-532.
16. Minamoto Y, Ogawa K, Abe H, Iuchi Y. Development of a serum-free and heat-sterilizable medium and continuous high-density cell culture. Cytotechnology 1991;9:35-51.

—ヒト エリスロボエチン製剤—

エスパー[®] 皮下用

6000・9000・12000・24000

(劇)(指)(要指) 一般名:エポエチンアルファ(遺伝子組換え)



●効能・効果 一抜粋一

①貯血量が800ml以上で
1週間以上の貯血期間を
予定する手術施行患者の
自己血貯血

用法・用量、及び使用上の注意等は添付文書をご覧下さい。

販売元・販売店
三共株式会社
〒107-8334 東京都港区新橋二丁目
製造元
麒麟麦酒株式会社
〒107-8334 東京都港区新橋二丁目

E S P O

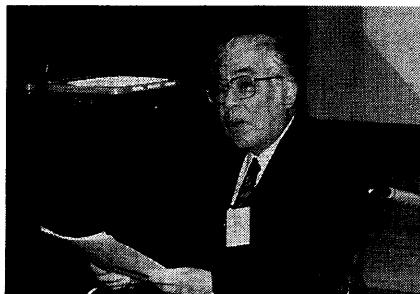


第9回北海道輸血シンポジウム

北海道赤十字血液センター 藤原満博, 平山文也,
佐藤典宏, 阿部英樹, 池淵研二

平成9年7月4-5日、北海道大学学術交流会館に約400名の聴衆の参加をえ、“輸血代替療法の展望”をテーマにシンポジウムが開催された。外国から2名、国内から14名の専門家を招き、輸血療法の現況、赤血球代替物、血小板代替物の開発状況、造血幹細胞の応用、サイトカインによる輸血代替療法などの講演が行われ、最後に“輸血代替療法への期待”と題して総合討論を行った。主な内容を見聞録の形で紹介したい。

輸血代替療法への期待



関口定美先生

北海道赤十字血液センター関口所長より、血液代替物開発がなぜ求められているかについて講演が行われた。赤血球製剤については200mL献血に加え400mL献血を導入することにより、また血小板製剤についてはアフェレーシス献血を導入することにより、ドナー数を減らしながら献血量が増えていった過程が示された。このような努力で血液製剤の自給—self-sufficiency—が達成されている。輸血副作用としてのウイルス感染伝播、同種抗原感作を予防するためにも、患者あたりのドナー数を減少させることが重要である。

北海道赤十字血液センター研究部, 〒063 札幌市西区山の手2条2丁目, Research Division, Hokkaido Red Cross Blood Center, 2-2 Yamanote, Nishi-ku, Sapporo 063, Japan.

あることも紹介された。

凝固因子、アルブミンなどの血漿分画製剤を製造するための原料血漿の著しい増加の推移が示され、凝固因子製剤に関してはリコンビナント製剤の導入に伴い、国内自給がほぼ完了しているが、アルブミン、グロブリンに関しては各々25%, 50%のレベルであることが示された。ヨーロッパ諸国と日本の使用量の比較が示され、アルブミン製剤は1.5-3倍、グロブリン製剤は1-2.5倍、凍結血漿は3-6倍、人口当たり日本が多く使用している実態が紹介され、自給率を上げる努力と平行してこれら製剤の適正な使用の努力も必要であることが示された。

次に輸血副作用に関して、各種スクリーニング検査が進歩し、献血時間診が充実することにより、輸血後のウイルス感染症の発生頻度は極端に減少したが、未だ完全にゼロにはなっていないこと、また致死的合併症であるGVHDが根絶されないことが示され、血液代替物開発の目標が血液製剤の自給達成とともに、安全な輸血を達成することにあることが強調された。安全性を高めるためには、ウイルス不活化、紫外線照射の手段もあることも示された。

最後に輸血副作用をゼロにし、より有効な輸血治療を達成するための方法論として、血液代替物開発を含め多くの要素があることがイラスト(Fig)で示された。

心臓血管外科手術における輸血節減の現況

国立循環器病センター麻酔科畔部長により同院の心臓血管外科手術における輸血の現状、輸血量節減の取り組みとその成果について講演が行われた。同院の心臓血管外科手術は年間約1000例でそのうち約800例が人工心肺症例である。第1の輸血節減の方法は自己血輸血の導入である。同院では希釈式自己血輸血、術中回収式自己血輸血、術前自己血輸血の順に導入され、術後自己血輸血は効果に乏しいため現在は行われていない。術前自己血輸血は厚生省業務局発行の自己血輸血ガイドラインに基づいて行っているが、冠動脈疾患患者の高齢化により70歳代の患者にも行っている。過去6ヶ月に75名の貯血を行っているが、採血を担当する医師の確保が問題であるという。希釈式自己血輸血は術前のヘモグロビン値が10g/dL以上の場合に400-600mLの範囲で行っており、術中回収式自己血輸血は腹部大動脈瘤手術に限って行っている。その他

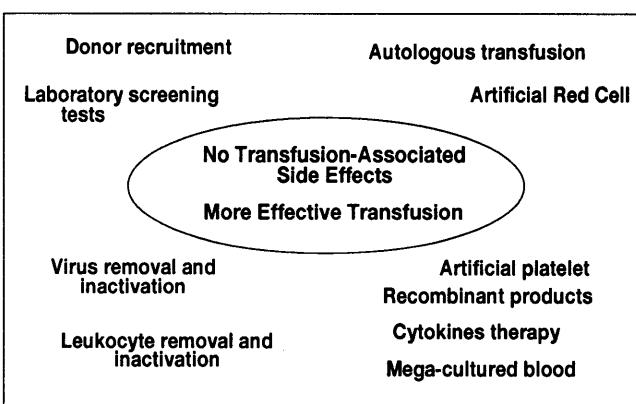


Fig. Future blood transfusion

の節減への方法として常温人工心肺の試みがある。常温人工心肺は末梢循環不全が少なく、手術時間の短縮が可能で経出

血量の減少から輸血量の節減が期待できるという。また、同院の冠動脈バイパス術(CABG)の患者の術前の背景因子について検討したところ、クレアチニン、複合手術、女性、血小板数、エリスロポエチン投与の有無が総輸血単位数に関係があったという。さらに、小児の手術においては1歳以上、身長70cm以上、体重9kg以上が無輸血手術を成功させる条件の1つだという。これらの努力の結果、同院の無輸血手術の比率はCABG42%，弁膜症56%，小児心臓手術52%，再手術16%と約半数となった。しかし、手術の高度化や対象患者の高齢化等のため、全体の輸血量は減少してはいないという。心臓外科医の丁寧な手術と周術期全身管理を行っている麻酔科医、臨床工学技士、集中治療医による合併症の防止が最も大切で効果的な輸血節減の方法である、と結んでいる。

人工赤血球、特に全合成系について

早稲田大学理工学総合研究センターの土田教授からは、まず現在研究されてる



土田英俊先生

赤血球代替物の概略について、その必要性も含めて紹介がなされた。現行の赤血球代替物は大きく2つのタイプ、すなわちヒト赤血球から分離したヘモグロビンを化学修飾したもの、もう一つは酸素運搬能を有する分子を化学合成したものに分けられる。土田教授らは長年この分野において研究を行っており、両タイプの赤血球代替物について彼らの最近のデータが示された。

ヘモグロビンを利用するものとして彼らは、リン脂質リポソームにヘモグロビンを封入しリポソーム表面をポリオキシエチレンで修飾したHb小胞体を赤血球代

替物として開発した。Hb小胞体の前臨床評価は最終段階にあり、acellular型の修飾ヘモグロビンにみられるような急激な血圧上昇は観察されず、皮下組織血管の微小循環動態においても満足な結果が得られていると報告した。現在は細網内皮系への影響や体内半減期の延長化へ向けた検討を行っていることである。

他方、オリジナリティの高い研究として注目されている、化学合成によるリピドヘム小胞体について紹介された。これは鉄リピドポルフィリン(リピドヘム)をリポソームの脂質二重膜に埋め込んだもので、可逆的に酸素分子を吸脱着する。調製も容易で量産、安価に供給ができ、真空乾燥して長期保存可能である。前臨床試験において30%脱血イヌへの投与では急性毒性もみられず、末梢組織への酸素輸送が確認され、有効性が示された。他にリピドヘムをアルブミンに結合させたアルブミン-ヘムの特性についても紹介された。

これまで世界的にもヒト由来ヘモグロビンが使用され、臨床段階に進みあるものもあるが、その一方でヒトに由来しない全合成系による赤血球代替物開発の重要性も高まりつつあることから、将来的にこの両者をバランス良く開発していくことが重要ではないかと思われた。

人工赤血球有効性テストの動物実験モデル

川崎医科大学高折名誉教授から開発中の血液代替物の有効性を確認するため前臨床試験のありかたに関する講演が行われた。血液代替物は外科、救急領域のみならず、血液疾患治療を含め内科領域でも応用されることが望まれるが、現状からは出血性ショックの治療、手術中の予想せざる大量出血の治療に利用されることが妥当であるとの考えが出された。出血性ショックモデルとしてビーグル犬に動脈脱血処置を行い、蘇生にHES、リポソーム内包ヘモグロビン(NRC)、自己血を用いた3群で動脈血圧、心拍数、心拍出量、動脈酸素含有量、酸素消費量の指標が計測され、いずれの指標でもNRC、自己血群で遜色ないことが確認された。またラットを用いた50%出血モデルでは筋肉、腎皮質の組織酸素分圧が測定され、

自己赤血球輸血群、NRC輸注群が、アルブミン輸注群に比べ高く組織酸素分圧を維持できることが報告された。

手術中に予想せざる大量出血があった場合のモデルとして、ビーグル犬に動脈出血を作成し、通常の手術時と同じようにしばらく晶質液(HES)の輸注を行い血液希釈状態を作成する。次いで更に動脈出血を行いHESで維持する群とNRCで維持する群に2つに分け、両者の循環動態を比較したところ、動脈血圧、心拍出量には差が認められないが、動脈酸素含有量、酸素消費量ともNRC群で高く、その有効性が確認された。

ジアスピリン分子内架橋型ヘモグロビンの開発と臨床治験成績

Baxter社Burhop氏より開発されたジアスピリンクロスリンクヘモグロビン(DLCHb)に関する基礎的、臨床的検討に関する講演が行われた。DLCHbはヘモグロビン分子の4量体を血中でも維持するため分子内に架橋が施され、酸素親和性は右方移動し酸素運搬能が高められている。赤血球を溶血、限外ろ過にてストローマ成分を除去、同時にエンベロープ型ウイルスも除去、さらにクロスリンクを導入し分子の熱安定性を確保し、70℃以上の熱処理を加えてウイルス不活化処理を加えてある。パルボウイルスを含め各種ウイルス値は7 log以上不活化されていることが報告された。保存は1年以上可能で、投与時に血液型検査、交差試験が必要ない、などの利点を有している。血中半減期は24時間以内と短いが、他のポ



Dr. K. E. Burhop

リマー型、リポソーム内包型製剤も同様であるため、特にデメリットとは言えないと考えている。血液製剤を輸血するまでのブリッジができるべきよい、と意見が

出された。

ヘモグロビン製剤に関する副作用としてよく議論される血管作動性に関しては、ブタを用いた実験の成績が紹介され、血中DCLHb量と血圧上昇に容量依存性がないこと、皮膚、筋肉の血流は減少するがバイタルオーガンである心臓、脳、消化管への血流量は維持されること、ヘモグロビンとNOの結合以外にエンドセリン、アドレナリンα受容体などを介した複雑な背景があることを強調した。

外傷、出血性ショックなど臨床例では酸素運搬能とボリュームの補充が要求され、この目的で応用される場合は血液代替物となるが、例えばストローク、心筋梗塞、敗血症、腎透析などの例で少量投与でも低血圧の回避、ラジカル障害回避が達成されるような用い方の場合は酸素運搬治療薬と呼びたい、と意見が出された。

臨床試験はヨーロッパで3相試験が完了し、約700例が対象となり、さらに3種類の臨床試験1500例を対象に2年がかりで実施する予定である。スイスでは製造プラントが設立したことが紹介された。

酸化ストレスと抗酸化酵素

大阪大学医学部生化学教室の谷口教授からは、生体内で発生する活性酸素と組織傷害の機序について、活性酸素消去系酵素の役割と酵素の失活過程に焦点を絞って報告がなされた。

グルコースやフルクトースはO₂⁻消去酵素であるCu,Mn-SODを非酵素的に糖化し、その活性を失活させる。その後Cu, Mn-SODはペプチドに分解していく、遊離のCuが生成する。Cu, Mn-SODの失活に伴つて蓄積したO₂⁻はこのCuと反応し、より反応性に富む活性酸素である·OHが生成する。この一連の反応にNOやさらにはONOO⁻が絡んできて、老化や糖尿病にみられる病態、特に細胞のアポトーシスと深くかかわっている可能性を示された。谷口教授らは、アミノ酸および核酸の解析により分子レベルの領域にまで迫つて、こうした反応の機序解明に取り組んでいることが紹介された。

サイトカイン療法は輸血の代替になり得るか

埼玉医科大学健康管理センターの平嶋教授はサイトカインの臨床適用が赤血球輸血の軽減に寄与できるか、について講演された。赤血球産生の重要なサイトカインであるエリスロポエチン(EPO)の血中濃度と貧血の程度の関係は疾患によって異なる。すなわち、鉄欠乏性貧血では直線的な逆相関が認められるのに対し、腎性貧血では貧血の程度に見合うだけのEPOの血中濃度の上昇が見られない。慢性関節リウマチやエイズ、悪性腫瘍に伴う貧血(ACD)でもEPOの血中濃度は低い傾向にある。これに対し、再生不良性貧血(AA)や骨髄異型性症候群(MDS)では異常に高いEPOの血中濃度の上昇が見られる。これらの関係がEPOの投与の有効性に関係しているという。

腎性貧血、特に腎透析患者へのEPO投与による輸血回避の効果は劇的であった。90%の患者にEPOは有効であり、不応例の90%も造血亢進による鉄欠乏が原因であり、大部分の症例で輸血の回避が可能であるという。ACDに対するEPOの有効性は、慢性関節リウマチにおいては明らかな効果は認められないとされていたが、最近の研究では鉄剤との併用で71.6%に有効であったという。また、進行癌患者においてQOLの改善がみられたという。米国ではエイズに対する有効性が確認され実用化されている。AAやMDSに対しては、EPOの大量投与により約30%以上の患者に貧血の改善、輸血量の軽減効果が認められたという。これらは顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の併用によりさらに効果が高まることが期待できる、という。また、同種血輸血を回避するための自己血輸血法の補助手段としてEPOが使用されており、確実に輸血量の軽減に寄与している。

以上より、EPOの導入により赤血球輸血の軽減が可能であり、今後はさらに疾患に応じたより有効な投与法の確立が必要である、としている。

トロンボポエチンの開発と臨床応用の可能性

トロンボポエチンは1994年にキリン

ビールをはじめとして4つの研究グループによりほぼ同時期にクローニングされた。宮崎洋氏はキリンビールにおいてトロンボポエチンのクローニングに携わり、その後もトロンボポエチンの研究に従事されている。そのような立場から氏はトロンボポエチンの発見の経緯、構造、生物活性、臨床応用の可能性などについて幅広く講演された。ポイントを要約して以下にまとめた。

トロンボポエチンはin vitroで巨核球系前駆細胞に対する増殖刺激作用および成熟促進作用を持つ。また、巨核球系のみならず、赤芽球系前駆細胞にも働きエリスロポエチンの存在下にその増殖を促進する。さらにIL-3やSCFと共同して未分化造血前駆細胞の増殖、分化をも促進する。抗癌剤投与や放射線照射などによる骨髄抑制動物モデルにトロンボポエチンを投与すると、血小板減少が軽減され、血小板回復が促進される。また、多能性前駆細胞や赤芽球系前駆細胞などの各種前駆細胞の回復、さらには白血球、赤血球の回復も促進される。これはin vitroで認められた赤芽球系前駆細胞や未分化造血前駆細胞に対する作用を反映しているものと考えられる。またG-CSFと同様にトロンボポエチンには造血前駆細胞を末梢血へ動員する作用が認められる。単独投与でも効果があるが、G-CSFあるいは制癌剤との併用により相乗的に働く。造血前駆細胞だけでなく造血幹細胞も動員されるのか否か興味が持たれる。米国、オーストラリア、ヨーロッパ、日本においてすでに臨床治験が開始されている。オーストラリアで行われた化学療法前の癌患者を対象とした臨床治験では血小板増加が認められ、また米国での肺癌患者を対象とした治験でも化学療法後の血小板回復に効果が認められている。しかし一方では血小板回復に効果がなかったとする報告もあり、今後投与方法などについて詳細な検討が必要である。

トロンボポエチンと血液事業

北海道赤十字血液センター池淵氏は血小板系造血因子トロンボポエチンが血液事業にどのような影響を及ぼすか、解析を試みた。まずマウス、サルを用いた血小板減少モデルでのトロンボポエチン投

との成績が文献的に概説され、放射線照射や化学療法後の血小板減少のナディアーグが高く維持され、血小板造血の回復が促進されることが報告された。ヒト肺ガン症例を対象とした臨床試験では、化学療法後の血小板ナディアーグが高く、ベースラインまでの回復が約2週間短縮されるが、骨髓性白血病症例を対象として臨床試験の成績では回復が著明に改善されるとは言えないこと、また症例の一部に血小板数が100万/ μ L以上になる症例があり、また一部の症例では血栓性静脈炎や肺梗塞が認められたことが紹介された。トロンボポエチン投与との因果関係は明らかにできないが、念頭に入れておかなければならぬと思われた。

ついで現状の血小板輸血の実際が解析され、血液センターから供給される血小板製剤の約70%が内科系に供給され、外科系、小児科系にそれぞれ8-9%が当てられていること、供給パターンから予想したところ化学療法や骨髄移植症例に対しては全体の28%が供給されていることが示された。文献的な考察からその約半分、約14%の血小板製剤がトロンボポエチンの臨床応用で使われなくなるのではないか、と推論された。なお、血液疾患としてターミナルステージと予想される症例に供給される量は24%に相当し、これらはトロンボポエチンが導入されても影響を受けないであろうと推論された。

トロンボポエチンの導入以外に輸血事業に影響を及ぼす因子として、細胞移植治療の今後の展開があると考えられ、造血回復の早い末梢血幹細胞移植の割合、血小板回復の遅いと考えられる臍帯血移植の割合が今後どうなっていくかも、血小板輸血量に影響するであろうと意見が出された。

血小板代替物の開発—血小板膜糖蛋白固相リポソームを中心に

慶應大学内科池田教授より、独自の血小板代替物の開発状況が紹介された。まず血小板の止血機構が概説され、血小板膜糖蛋白GPIbの重要性が紹介された。リコンビナントのGPIbが大量産生され、サイズ200nmのリポソーム上に固相化させ、障害を受けた血管内皮下組織に粘着することが期待されるモデルである。フロー

サイトメトリー法でリポソーム上にGPIbが発見していること、リストセチン存在下で凝集が誘導されること、特異的抗



池田康夫先生

GPIb抗体でこの凝集反応が抑制をうけること、が示された。またリポソームを蛍光色素で標識し、正常の血小板と一緒に刺激剤で凝集を惹起させると、できた凝集塊に蛍光色素が取り込まれることから、リポソームが血小板凝集に関与したことが、赤い色として視覚に訴えた。このリポソームが実験動物モデルで血小板代替物として機能するか、また血管内をどのように循環するか、血管障害部位に到達するか、など確認する予定であるとのことであった。

また血小板輸血がこれまで予防的に用いられてきたが、どのレベルまで血小板が減少すると自然出血が生じるか、血管壁のintegrityを維持するために血小板はどの程度関与しているか、維持するためには最低限どれくらいの血小板数が必要なのか、など病態生理の解明も重要なと意見を出された。

血小板代替物へのアプローチ

北海道赤十字血液センター丹羽氏より次のような講演が行われた。輸血臨床において血小板輸血が増加しているが、血小板製剤はその保存が室温、72時間と規定されているため、その需要と供給を合わせることが血液センターサイドとして大変な業務であることが、先ず示された。血小板の低温保存に関しては、in vitro評価系で見る限り血小板機能は高く維持されるが、一方in vivoでの血小板寿命が短

く、このままでは応用できること、最近細胞内Caをキレートし、かつ細胞骨格アクチン重合を阻害する薬剤(Quin-2, Cytocalasin B)を組み合わせることで、形態が維持され、洗浄後の血小板凝集能が維持されたとする成績が報告された。また米国で発表されたThromboSolが、細胞の情報伝達系の種々のステップを抑制する薬剤の組み合わせであることと、それを用いた血小板の低温保存および凍結保存が機能を温存するのに有効であることが紹介された。

丹羽氏はこれらのアプローチとは別に、培養細胞から血小板様粒子を产生する系に関するデータを発表した。ヒト白血病細胞株CMKは培養中に大型の巨核球様細胞を產生すること、また大量に血小板サイズの粒子を產生することが紹介された。ただしその細胞表面抗原の解析から、正常の血小板に存在し血小板粘着過程に最も重要な機能を有する糖蛋白GPIbの発現が乏しいこと、トロンボポエチンは細胞の増殖を刺激するがGPIbが発現するように分化を誘導しないこと、抗ウイルス剤リバビリンがある程度GPIbの発現を誘導すること、などが示された。またGPIb陽性細胞だけを純化し、それから新規の細胞株を樹立しようと試みたが、この細胞はGPIbを発現する段階で細胞増殖を停止するため、細胞株を得られなかつたことも紹介された。

以上細胞培養の技術を用いて血小板様粒子を作成するという方法論が紹介された。なお正常の造血幹細胞、前駆細胞の培養から血小板様粒子を作成するテーマも試みる予定であるとのことであった。

重合性リン脂質を利用した人工酸素運搬体の開発

日本油脂株式会社の守沢氏らは、人工酸素運搬体としてヒトヘモグロビン脂質二重膜で包埋した、リポソーム型人工赤血球の開発を行っており、今回は主としてその機能評価の成績を紹介された。

守沢氏らが開発した人工赤血球(Artificial Red Cells; ARC)の特徴は、リポソーム構成脂質に重合性リン脂質を用いるリポソームの物理的安定性を確保したことにある。これにより凍結再融解においても、粒子系の変化や内包ヘモグロビン

の漏出が認められないことが示された。

ラットを用い、急性毒性、網内系への影響、エンドトキシンとの相互作用について検討した成績が示された。急性毒性のLD₅₀は6,000mg/kg以上であり、2,000mg/kg投与においては血液凝固能等に変化はみられなかった。またGOT、GPT等の血液生化学的マーカーは対照群と比較して有意差はあるものの生理的変動範囲にあり、白血球数などの血液学的マーカーでは有意差はみられなかった。ただ、肝臓、腎臓、脾臓への蓄積が顕著であり、細網内皮系へ負荷がかかっていることが示された。一方、acellular HbでみられたようなLPSとの相互作用による致死作用はARCではみられなかった。ビーグル犬を用いた70%交換輸血では、ARCがそのHb濃度に応じて末梢組織へ酸素を運搬していることが確認され、ARCを投与されたビーグル犬は副作用も認められずその後2年以上生存しているとのことである。

ARCは長期保存性、急性毒性、酸素運搬能について高い有効性が示された。ARC投与ビーグル犬が副作用もなく長期生存しているという事実はあるが、組織病理的には細網内皮系、特に脾臓への負荷が大きいことが示され、これらの点が今後の検討課題ではないかと思われた。

造血幹細胞移植と血液事業

慶應大学内科岡本講師より造血幹細胞移植治療における輸血必要量に関する講演が行われた。先ず骨髄移植では同種よりも自家骨髄移植の方が輸血必要量が少なく、同種骨髄移植では非血縁、血縁間に特に差が見られなかった。最近症例数が多くなりつつある末梢血幹細胞移植は骨髄移植に比べ、血小板造血の回復が早く、輸血必要量も少ないとが示された。また一般的に移植後早期の合併症の頻度・重症度が高くなるハイリスク症例、ABO不適合移植例では輸血必要量が多くなる傾向が認められた。

興味あることに、移植後血小板製剤を輸血するトリガーは従来2万/ μ Lとされていたが、合併症としてDIC、発熱、敗血症、VOD、重症粘膜炎、脾腫が認められない症例ではそのレベルを1万/ μ Lに下げても、出血のエピソードが増えないという臨床研究の結果が報告された。移植症

例の危険因子を把握することで輸血のタイミングが工夫でき、輸血量の軽減が図れる可能性が示唆された。

輸血に依存する重症再生不良性貧血、骨髄異形成症候群症例の治療率を移植治療によって高めること、末梢血幹細胞移植を用いて腫瘍の治療率を向上させることができ、血液製剤の必要量を考える上で重要なうえと考えられた。

造血幹細胞のin vitro増幅

造血幹細胞を培養しその数を増やすことは近い将来、造血幹細胞移植療法において最も重要な課題の一つになるであろう。米国 University of South Carolina の小川真紀雄教授はマウスの骨髄細胞を用いて、造血幹細胞の in vitro 増幅を試みている。造血幹細胞集団は抗癌剤である5-fluorouracilを前投与したマウスの骨髄より



小川真紀雄先生

精製したLin⁻Sca-1⁺c-kit⁺細胞を用いている。100個のLin⁻Sca-1⁺c-kit⁺細胞をSCF、IL-6、IL-11、エリスロポエチンと共に培養し、7日後に得られた細胞を回収し、放射線照射マウスに投与し、2ないし6ヵ月後にレシピエントマウスの造血系の再構築を検討している。フレッシュなLin⁻Sca-1⁺c-kit⁺細胞を100個投与した放射線照射マウスをコントロールとして比較している。残念ながらこの実験ではコントロールマウスの方が再構築率が高く、造血幹細胞は増幅されなかったのであるが、7日間の培養後にも造血幹細胞活性が残っていることから、小川らはこの系を用いて培養系での造血幹細胞の維持に対する増殖因子の影響を検討した。そうするとIL-3やIL-1は培養系での造血幹細胞の維

持に抑制的に働き、また、flt3 リガンドはSCFより造血幹細胞の培養中の維持により効果的に働くことを明らかとした。このように、造血幹細胞増幅はならなかつたが、用いる増殖因子の組み合わせを考えるうえでの基礎的データは得られつつあるようだ。

サイトカインによる造血制御とex vivo造血幹細胞増幅

東京大学医科学研究所癌病態学研究部の中畠龍俊教授は造血幹細胞/前駆細胞の増殖、分化におけるサイトカインの役割とex vivo増幅の試みについて講演された。

造血幹細胞/前駆細胞が種々の血球系に分化していく機構は生物学のなかでも最も興味深い研究課題のひとつである。サイトカインなどの環境因子が分化の方向を規定するとする deterministic model と、血球分化は個々の細胞の内在的な能力によりランダムに発現されるのでありサイトカインは分化の方向の決定には関与しないとする stochastic model 等の説があるが未だに結論は出ていない。そこで好中球やマクロファージの増殖因子として知られるGM-CSFあるいは好中球の特異的増殖因子であるG-CSFのそれぞれのレセプターを組み込んだトランスジェニックマウスを作成し、血球分化の機構を解析した。GM-CSFあるいはG-CSFの存在下に培養するといずれのマウスの造血前駆細胞も好中球やマクロファージのみならず種々の血球細胞に分化したことから、サイトカインは分化の方向付けを決定するのではなく単に前駆細胞の増殖因子として働いているのだろうと結論している。

BFU-E、CFU-MegやLTCICを含む未分化な造血前駆細胞はIL-6レセプターは発現していないがそのシグナル伝達分子であるgp130を発現しており、IL-6と可溶性IL-6レセプターの複合体が直接細胞上のgp130に結合すると未分化な造血前駆細胞に増殖シグナルを与えるという結果が示された。またこのgp130を介するシグナルにc-kitを介するシグナルが加わるとエリスロポエチンの非存在下に赤血球の産生が起こることも示された。IL-6、可溶性IL-6レセプター、c-kitリガンドであるSCFはヒトの血清中に多量に存在していること、

gp130のノックアウトマウスは胎生期に死亡するが、その多くに貧血や赤血球の成熟障害が見られることなどを考えあわせると、gp130とc-kitを介するシグナルは生体内で赤血球産生の第二の経路として働いている可能性があり興味深い。さらに未分化な造血前駆細胞の増幅にも有効なシグナルとして働いている可能性も示された。

ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた造血細胞の大量培養の試み

北海道赤十字血液センターの平山氏らはラジアルフロー型バイオリアクター、造血細胞の高密度大量培養を試みている。血球細胞の体外産生や造血幹/前

駆細胞の体外増幅にもつながる可能性があり興味深い。

ラジアルフロー型バイオリアクターはキリンビール基盤技術研究所の水谷氏らのグループにより開発されたもので、40μmの蜂巣状の空隙をもった多孔性のガラス担体を容器に充填し、細胞培養を行うものである。多孔性の担体であるが故、その表面積は非常に広く担体1mL当たり900cm²にもなり、細胞はこの表面に接触しながら増殖するので、担体1mLあたり1×10⁸個前後もの細胞が培養可能となる。また培養液を外周から中央に向かって流すことにより(ラジアルフロー)、培養液の流れによる細胞への傷害が軽減され、容器内の酸素、栄養素の濃度も比較的均一となったことも高密度大量細胞培

養を可能にした一つの大きな要因である。

北海道赤十字血液センターではこれまでヒトの造血幹細胞/前駆細胞の増幅のメカニズムについて造血支持能を持つマウスストローマ細胞株MS-5を用いた共培養系を使って検討してきている。ヒト臍帯血CD34⁺細胞をSCFとG-CSFとの存在下にMS-5細胞の単層培養上に播種すると骨髄系細胞のみならずB-リンパ球系の細胞の増殖、分化が認められる。このようなマウスストローマ細胞株と造血前駆細胞との共培養をラジアルフロー型バイオリアクター内で再現し、血球細胞の大量産生あるいは造血幹/前駆細胞のex vivo増幅を目指している。

●事務局たより

日本血液代替物学会 第4回 定期総会 議事録

日時：平成9年9月7日(日) 17:00-17:30

会場：リーガロイヤルホテル早稲田

1. 開会

2. 会長挨拶

3. 議事

1) 平成8年度事業報告承認(資料1にて承認)

2) 平成8年度収支決算承認(資料2a および2bにて承認)

3) 平成9年度事業計画(資料3aにて承認)および収支予算決議
(資料3bにて承認)

4) 役員人事

5) 7-ISBSの細目決定

6) 贊助会員に関する付則

7) 第2次評価委員会設置(委員長 清水 勝)臨床治験ガイドライン作成

第5回年次大会開催(大会長 関口 定美)平成10年9月4, 5日於 札幌

4. 閉会

資料1—平成8年度事業報告(平成8年4月1日～平成9年3月31日)

1) 第3回定期総会—平成8年6月18日(火)福島ビューホテル

2) 第3回年次大会—平成8年6月18日(火), 19日(水)福島ビューホテル
大会長講演、教育講演1件、招待講演4件、一般演題10件、シンポジウム11件。参加者延べ200名

3) 会誌「人工血液」の発行—第4巻2号(33頁), 第4巻3号(28頁), 第4巻4号(29頁), 第5巻1号(22頁)各1000部発行。

4) 理事会

96/1: 平成8年 6月17日(月) 事業報告／収支決算／事業計画／予算の承認

96/2: 平成8年10月29日(土) 血液代替物国際会議／第4回血液代替物学会総会開催／小委員会の設置の件

96/3: 平成9年 1月29日(水) 評価報告書提出/国際会議報告(ISBT)／年次大会

96/4: 平成9年 3月(書面) 収支決算／予算案

5) 編集委員会

96/1: 平成8年 6月19日(水) 年次大会／学会长期展望／新情報提供

96/2: 平成8年 8月23日(金) 国際学会報告／ISBSの抄録集／投稿依頼／購読または閲覧依頼

6) 第7回血液代替物国際会議の準備会合

第1回募金委員会: 平成8年 3月 5日(火)

第2回募金委員会: 平成8年 6月17日(月)

第3回募金委員会: 平成8年10月29日(火)

第1回プログラム委員会: 平成8年10月23日(水)

第1回組織委員会: 平成8年 6月17日(月)

第2回組織委員会: 平成8年10月29日(火)

資料2a—平成8年度会計報告収支決算表(自平成8年4月1日 至平成9年3月31日)

収入		支出	
摘要	金額	摘要	金額
前期繰越金	4,774,881	会誌出版費	2,844,465
正会員会費	1,170,000	集会・委員会費	1,371,472
賛助会員会費	2,400,000	年会補助費	1,000,721
維持会員会費	6,000,000	国際会議補助金	1,000,000
購読会員会費	114,000	事務人件費	3,229,436
広告代・雑収入	345,000	事務費	547,535
寄付	50,000	基金組込	2,000,000
利息	36,157	次期繰越金	2,896,409
合計	14,890,038	合計	14,890,038

資料2b—貸借対照表(平成9年3月31日現在)

貸方		借方	
摘要	金額	摘要	金額
現金	682,266	基金	8,000,000
銀行普通預金	1,749,409	次期繰越金	2,896,409
銀行預金(編集)	464,734		
銀行定期預金	8,000,000		
合計	10,896,409	合計	10,896,409

資料3a—平成9年度事業計画(平成9年4月1日～平成10年3月31日)

- 1) 第4回定期総会の開催—平成9年9月7日(日)リーガロイヤルホテル早稲田
- 2) 第4回年次大会(兼第7回血液代替物国際会議)の開催(大会長土田 英俊)一平成9年9月8日(月)～10日(水)早稲田大学国際会議場
- 3) 「人工血液」の発行—第5巻2号(6月), 3号(9月), 4号(12月), 第6巻1号(3月)の発行予定。1000～1200部印刷。
- 4) 会議一総会 1回, 評議員会 1回, 監事會 1回, 理事会 4回, 会誌編集委員会 4回, 年次大会実行委員会 2回

資料3b—平成9年度予算(自平成9年4月1日 至平成10年3月31日)

収入		支出	
摘要	金額	摘要	金額
前期繰越金	2,896,409	会誌出版費	3,200,000
正会員会費	1,250,000	集会・委員会費	1,400,000
賛助会員会費	2,600,000	年会補助金	1,000,000
維持会員会費	6,000,000	国際会議補助金	1,000,000
購読会員会費	114,000	事務人件費	3,200,000
広告代・雑収入	300,000	事務費	700,000
利息	40,000	基金組込	2,000,000
合計	13,200,409	予備費	700,409
		合計	13,200,409

●事務局たより

資料4-日本血液代替物学会 役員名簿

顧問	尾形 利郎 高久 史麿 堀 原一 遠山 博	東海大学 医学部 教授 自治医科大学 学長 筑波大学 名誉教授 埼玉医科大学 総合医療センター 所長
会長	土田 英俊	早稲田大学 理工学部 教授
副会長	関口 定美	北海道赤十字血液センター 所長
庶務理事	小林 紘一	慶應義塾大学 医学部 教授
会計理事	池田 康夫	慶應義塾大学 医学部 教授
理事	阿岸 鉄三 清水 勝 友田 煉夫 薄場 彰 湯浅 晋治	東京女子医科大学 教授 東京女子医科大学 教授 東京医科大学 教授 福島県立医科大学 講師 順天堂大学 医学部 教授
(事務局長)	西出 宏之	早稲田大学 理工学部 教授
(会誌担当)	池淵 研二	北海道赤十字血液センター 副所長
監事	桜井 靖久 藤村 一	東京女子医科大学 教授 生産開発科学研究所 学術顧問

日本血液代替物学会 評議員名簿

阿岸 鉄三	東京女子医科大学 教授	高久 史麿	自治医科大学 学長
浅野 茂隆	東京大学 医科学研究所 教授	高橋 晃	テルモ(株) 常務取締役
阿部喜代司	医療技術短期大学 教授	高橋 恒夫	東京大学 医科学研究所 教授
飯塚哲太郎	理化学研究所 主任研究員	田中 勘	防衛医科大学 教授
池田 康夫	慶應義塾大学 医学部 教授	土田 英俊	早稲田大学 理工学部 教授
池淵 研二	北海道赤十字血液センター 副所長	土屋 喜一	早稲田大学 理工学部 教授
薄場 彰	福島県立医科大学 講師	遠山 博	埼玉医科大学 総合医療センター 所長
大柳 治正	近畿大学 医学部 教授	豊田 忠之	東部地域病院 院長
岡田 浩佑	広島大学 保健センター 教授	友田 煉夫	東京医科大学 教授
尾形 利郎	東海大学 医学部 教授	中井 一士	血液製剤調査機構 理事
川村 明夫	札幌北楡病院 理事長	西 勝英	熊本大学 医学部 教授
小林 紘一	慶應義塾大学 医学部 教授	西出 宏之	早稲田大学 理工学部 教授
小室 勝利	国立感染症研究所 部長	馬場 正三	浜松医科大学 教授
齋藤 英彦	名古屋大学 医学部 教授	平澤 博之	千葉大学 医学部 教授
酒井 清孝	早稲田大学 理工学部 教授	藤巻 道男	東洋公衆衛生学院 学院長
桜井 靖久	東京女子医科大学 教授	藤村 一	生産開発科学研究所 学術顧問
鮫島 達也	青山学院大学 理工学部 教授	堀 原一	筑波大学 名誉教授
四釜 慶治	東北大大学 理学部 教授	宮尾 秀樹	埼玉医科大学 総合医療センター 助教授
清水 勝	東京女子医科大学 教授	宮崎 保	札幌通信病院 院長
十字 猛夫	日本赤十字社中央血液センター 所長	元木 良一	福島県立医科大学 学長
杉田 良樹	茨城県立医療大学 教授	湯浅 晋治	順天堂大学 医学部 教授
関口 定美	北海道赤十字血液センター 所長	横山 和正	(株)ミドリ十字 常務取締役
高折 益彦	川崎医科大学 名誉教授	(敬称略、ア順)	

投稿規定 Short Version

本誌は、血液代替物開発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を集めること。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。

執筆規定

DTP (Macintosh)による編集作業によって作製するため、ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。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) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー2部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。Macintosh以外を用いるときは、テキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 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、英文所属、ついで筆頭著者の住所、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。

- 3) 総説、原著、および報告については、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。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、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。
- 6) 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。
- 7) 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。本文ハードコピー上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。
- 8) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では2), 3-5), 1, 4-6)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。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三、岩本 清. リポソームの調製. 野島庄七、砂本順三、井上圭三 編. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracci M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 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。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを超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。

編集委員会

●池淵研二（委員長）、薄場 彰、柿崎 徹、武岡真司、西出宏之、宮尾秀樹、横山和正、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 サイマル・インターナショナル

人工血液 vol. 5 (3) 1997年9月30日発行

〒169 東京都新宿区大久保3

早稲田大学理工学総合研究センター55S棟701号

TEL (03)5286-3120 FAX (03)3205-4740

〒063 札幌市西区山の手2条2丁目

北海道赤十字血液センター内

TEL (011)613-6640 FAX (011)613-4131

〒160 東京都新宿区荒木町13-9

TEL (03)3226-2831 FAX (03)3226-2813

再生紙を使用