

人工血液

第 12 卷 第 3 号 2004 年 11 月

目次

会告	66
論説	酸素運搬体の臨床治験へ	高折益彦 67
総説	細胞から血小板を作る	藤元貴啓 74
	血小板と血小板代替物の微視的運動の バイオメカニクス	藤田英輝, 谷下一夫 82

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 12 No. 3 November, 2004

Contents

<i>Announcement</i>	66
<i>Review: Requirement on Physicochemical Properties of Artificial Oxygen Carrier Prospecting Clinical Trial in the Future</i>	<i>Masuhiko Takaori</i>	67
<i>Production of Platelets from Cells in vitro</i>	<i>Tetsuro-Takahiro Fujimoto</i>	74
<i>Biomechanics of Microscopic-motion of Platelet and its Substitute in the Blood Flow</i>	<i>Hideki Fujita, Kazuo Tanishita</i>	82

会 告

第12回日本血液代替物学会年次大会

会 期：平成17年6月6日（月）、7日（火）
会 場：早稲田大学理工学総合研究センター 会議室
大会長：武岡 真司（早稲田大学 理工学部）

現在、我が国が世界に誇れる血液代替物が、医工連携そして産学共同体制によって漸く開花してきた状況にあります。しかし、臨床現場からの声に常に耳を傾けて何のため何をつくるのか、もう一度確認をする必要があるのではないかと考えております。そして、血液代替物の品質や臨床試験に求められるガイドラインの整備も急を要しております。

本年次大会では、赤血球や血小板の代替物や投与可能な免疫グロブリンを主な対象として、最先端の研究内容や開発の現状を学術討論する場であると同時に、臨床に向けたアプローチを議論しその方向を見つける大会にしたいと考えております。是非、ふるってご参加ください。

URLは本学会のホームページ

<http://www.blood-sub.jp/>

に開設します（トップページ「学会のお知らせ」をクリックして下さい）。詳細は次号の会告に掲載する予定ですが、本サイトに随時アップロード（12月以降）してゆきますので、ご覧ください。それまでの問い合わせは大会事務局までお願いします。

事務局：〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1
早稲田大学理工学部
武岡 真司
tel & fax: 03-5286-3217

酸素運搬体の臨床治験へ Requirement on Physicochemical Properties of Artificial Oxygen Carrier Prospecting Clinical Trial in the Future

高折益彦

Masuhiko Takaori, M.D., Ph.D.

和文抄録

現在わが国において研究、開発されている細胞型の酸素運搬体（人工赤血球：HbV）が臨床で人工血液として用いられるためには物性的にどのようなことが必要であるか、とくに、in vitro, in vivo においてどのような条件が要求されるか検討した。さらにその安全性を確かめる前臨床試験での検討項目について、動物種、研究回数、試験物（酸素運搬体）の投与方法、生体での反応観察項目、およびその具体的な検査方法について述べた。そして次の治験に進んだ場合での計画作成の要点、すなわち確実な成績（definite evidence）を得るための要点、倫理的配慮、手順について検討した。

Abstract

In this review, it was described what physicochemical properties should be required for oxygen carrier as blood substitute, particularly on oxygen transport property in vitro and effectiveness for oxygen metabolism in vivo. For sufficient preclinical tests it was discussed about animal species, number of the animals for each examining item, administration modes (single and repeated) as drug safety standpoint. And further it was proposed what vital functions should be examined and what clinical test should be applied in the preclinical study. In addition, crucial points in clinical trial of phase II, which will be performed in the future, was proposed to obtain definite evidence and to be performed on satisfactory ethical base.

Keywords

artificial blood, oxygen carrier, artificial red cell, clinical trial safety & ethical requirement, GLP, GCP

過去10数年間、酸素運搬体の開発に種々の努力が払われてきた。すでに欧米では2種類の酸素運搬体（人工赤血球液）の開発が臨床治験段階にまで進められた。しかしいずれも以後の開発は中止され、治療薬として用いられるに至らなかった^{1,2)}。しかしその後南アフリカでは牛ヘモグロビン重合型の酸素運搬体が人工赤血球として臨床治験で使用された³⁾。一方わが国では専ら細胞型の酸素運搬体の開発が進められ、かなりの研究成果が得られている。それらは早稲田大学での開発製品 Hemoglobin Vesicle (HbV)、テルモ株式会社での Neo Red Cell (NRC) である。しかしいまだ臨床治験にまで踏み込む段階には至っていない。この点をふまえ本稿においてはどのような点を早急に満足させ、その完成によって臨床治験への道を開くか、そしてそれについて臨床治験を行なうならばどのような考慮が必要か考察することとした。

1. 人工赤血球液としての物性的必要条件

1) 生体内に投与される酸素運搬体としての必要条件

上記の細胞型酸素運搬体はその目的とする機能を発揮するためには、まずそのものが物理・化学的に生体の循環系の流動している血液中に投与され、酸素を運搬する性格を有することが必要である。すなわち人工赤血球液は常温、そして生体内の温度下で流動性を有し、その粘度は37において生理的な血液のそれと同等であることが必要である。これらのことは生体への投与前、in vitroでの研究にてその可能性が予想される。そしてその100 mlは外界の酸素分圧が100-200mmHg (37)の環境下で10-15 mlの酸素を含有し、外界の酸素分圧が30-40mmHg (37)で含有する酸素の30-40%を放出することが要求される。すなわち上記の酸素含有量と酸素放出率とは生体の末梢組織における酸素代謝を維持するに必要な酸素供給条件として考えられる。末梢組織の細胞での酸素代謝を維持しうる酸素分圧は

30-40 mmHgと云われているが、この酸素分圧が必ず必要か否かはいまだ明かになっていない。すなわちどの程度の細胞内外の酸素分圧較差が必須であるかと証明した研究は少ない。このことは酸素運搬体として使用されるヘモグロビン (Hb) のP₅₀を決定する根拠として重要である。たとえば心筋の酸素抽出率は50%、あるいはそれ以上になりうる。すなわち心筋組織の酸素分圧は30mmHg以下となりうる。Huchら⁴⁾は新生児の皮膚の酸素分圧は0-7mmHgであると報告している。Moss⁵⁾は犬の心筋内膜層の酸素分圧は10mmHg、外膜層では18mmHgと報告している。またMacMillanら⁶⁾は脳では毛細管と組織細胞との分圧差が10mmHgであれば十分な酸素供給が可能であると報告している。一方慢性貧血、慢性低酸素症にともない赤血球内の2,3 DPG (diphosphoglycerol)が増加し、酸素供給量を増加させることが知られている。すなわちHbの酸素親和度が低下することにより組織への酸素供給量が増加する^{7,8)}。さらにきわめて短時間でもHbのP₅₀値が上昇することも認められている⁹⁾。したがって正常組織に対する酸素供給でのHbのP₅₀にはかなり大きな認容域があると思われる。特定の組織 (たとえば小動脈血管) への余剰酸素供給 (luxurious supply) を防ぎ、すべての末梢組織への適切な血流と酸素供給を行なうためにP₅₀を生理的な値よりもやや低値 (15-20mmHg) に選択することも説明できる。

また酸素運搬小胞体は一定のサイズを有している。そのサイズで生体の循環系をスムーズに流れなければならない。現在のところHbV、NRCとも球形であって、その形状は末梢循環系での剪断力 (shear stress) により変形することは認められていない。そのため毛細血管をスムーズに通過するため500nm以下の直径を有することが必要である。製造物としての保存期間においても、また血流が静止に近い状態であっても常に酸素運搬小胞体はその媒体 (medium) 中で均一に分布していることが必要である。また逆に高流速下での媒体中でも均一濃度に分布していることが要求される。さらにこのような酸素運搬体は血液内の血漿蛋白、あるいは外部から投与される人工膠質と反応し、集合、凝集することがあっては不都合である。むしろそのような酸素運搬体内に生体に対して毒性を有する物質 (病

原体、発熱物質など) を含有してはならない。

一般にHbは豊富な酸素の存在下においてmet-Hb (メトヘモグロビン) に酸化される。血管内の酸素分圧100-200mmHg (37℃) 下においてHbからmet-Hbへの変化率 (半減期) は少なくとも20-30時間であることが必要である。生理的赤血球にはこの酸化を防止し、還元する酵素系が存在する。この酵素を酸素運搬小胞体内に含有させることもできるがその能力維持に限界がある。

Table 1.は早稲田大学で作成された製造物であるHemoglobin Vesicle (HbV) の性状の一例である。これにみられるごとくこの製造物は上記の必要条件を十分に満たしている。

2) 生体内に投与される酸素運搬体としての

安全・安定・純正性

酸素運搬小胞体はいかなる生体組織に対しても反応を示すことがなく、組織を障害しないことが必要である。さらに室温下、あるいは保冷庫内において少なくとも2年以上分解・変性を示すことがないことが望まれる。またさらなる長期間においてかりに分解・変性を生じてもその量は1%以下であり、かつその分解・変性物も生体組織に対して反応性、毒性を有さないことが要求される。そしてこの間も酸素運搬小胞体の媒体内での分布、分散状態にも変化がないことが必要である。また原料、製造過程で混入する不純物、病原体、発熱物質などの除去が容易であることも要求される。

2. 生体内での人工酸素運搬体としての機能

生体循環血液中に人工酸素運搬体が投与された際に肺において酸素を取り入れ、これを末梢循環系で放出し、それにより組織酸素代謝を維持することが人工酸素運搬体としての最大の機能である。上項の1.で述べた人工酸素運搬体の物性から肺循環系における酸素運搬小胞体が異常な毛細血管内分布、ならびに肺区域別分布を示さない限り肺における十分な酸素抱合は可能であろう。さらに安全性の項において検討されるこの人工酸素運搬体液が呼吸機能、とりわけ肺のガス交換機能に影響しないかぎり可能であろう。

Table 1. Physicochemical Properties of HbV (Waseda)

		Analytical Methods
diameter (nm)	220 - 280	Light Scattering method
P ₅₀ (torr)	25 - 32	Hemox Analyzer
Hemoglobin Content (g/dl)	10 ± 0.5	Cyanomethemoglobin method
Total Lipid Content (g/dl)	5.3 - 5.9	Molibuden-blue method
PEG/Lipid ratio (mol%)	0.3	Hydrogen-NMR method
met Hb/Hb ratio (%)	< 3	Spectrophotometry
Endotoxin (EU/ml)	< 0.2	Limulus Lysate method
Viscosity in 5 % Albumin Sol. (cp at 230/sec shear rate)	3.7	Capillary method

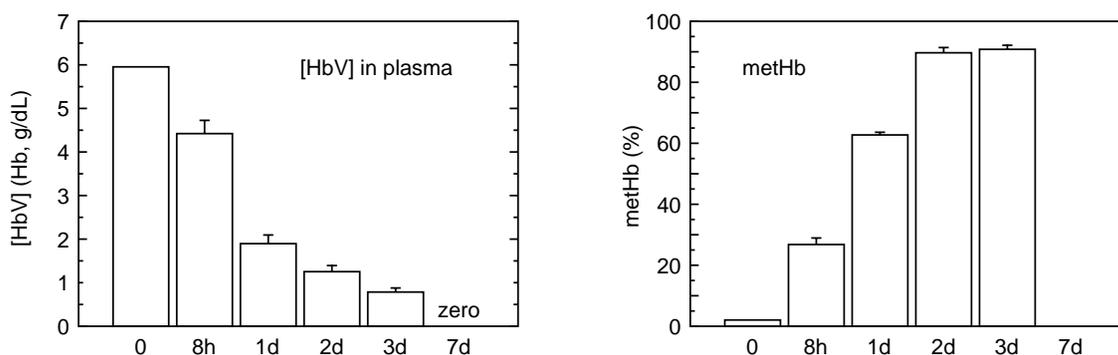
authorized method by GLP

このようにして酸素化された酸素運搬小胞体が大血管を経て小血管系から毛細血管系に到達した際に十分な量の酸素を放出することが必要である。酸素運搬小胞体は正常赤血球に比してその形状が小さいためにより血管壁に近く流れる。そのため毛細血管系に到達する以前に含有する酸素を血管壁細胞に放出してしまう可能性がある¹⁰⁾。そしてそれによるluxurious supplyから小動脈の攣縮を来たし、その下流部への血液低下を来たす可能性がある。また細動脈-細静脈短絡血管を介して静脈系に比較的大量の酸素運搬小胞体が流出する可能性もある。そのため確実に微小血管系を酸素運搬小胞体が、特に均一に流れることを確認することが必要である。

人工酸素運搬体の臨床で使用は多岐にわたる。しかしそのもっとも重要で、かつ使用頻度の高いものは手術、外傷による出血に対する治療であろう。すなわち血液の持つ酸素運搬作用と循環血液量維持効果とが期待される。そしてこの血液代替作用は少なくとも輸血用血液が入手できるまでの時間、できれば生理的造血機能により赤血球、および血漿が血管内に補充されるまで持続することが望ましい。すなわち24-48時間の血管内維持効果が望まれる。血漿減少に対しては生体の代償作用としての血管外組織液の血管内流入により、また治療としてのアルブミン製剤、あるいはデキストラン、ヒドロキシ澱粉のような人工膠質液の注入で対処することができる。また赤血球減少に対しては生体の代償機能、あるいは赤血球新生^{11,12)}により部分的に補うことが可能であり、Hb値として最低限5g/dlまで回復、維持することにより生命の危機は回避できる¹³⁾。一方わが国で開発が進められている酸素運搬小胞体が循環血液内に投与された場合、それが異物として認識され、網内系細胞により貪食され次第にその数を減じる。人での酸素運搬小胞体の血中半減時間は30-40時間と予想されている¹⁴⁾。一方小胞体内のHbは酸素存在下においては次第 met-Hbに酸化され、その酸素運搬能は次第に低下する。この変化を考慮して少なくとも15-20時間の血液中機能的半減時間が酸素運搬小胞体に望まれる。また現在

わが国において開発されつつある酸素運搬体はいずれも酸素運搬小胞体を生理食塩水に浮遊させたものである。生理食塩水、あるいは晶質液の循環系への投与にともなう血液量増量効果は投与量の13-20%と少ない^{15,16)}。したがって出血に対してこのような人工酸素運搬体を使用する場合には本質的になんらかの膠質を添加しないかぎり循環血液量を維持することができない。さらにこのようなHbを内包した酸素運搬小胞体が末梢の微小循環血管内を大血管内同様の密度で均一に流れることが必要である。さらにこれら小胞体同士が凝集、あるいは集合することがなく、また既存の赤血球と凝集、集合を生じないことが要求される。これは末梢組織への酸素供給効率を維持するために必要な条件である。それには酸素運搬小胞同士、その表面の電気的反撥性が生体内の血液中でも維持されること、酸素運搬小胞体が電気的に、あるいは化学的に赤血球に、あるいは血管内皮細胞表面と結合しないことが要求される。酸素運搬小胞体がハムスター血管内に投与された場合の生体顕微鏡観察¹⁷⁾では赤血球と凝集、集合も、また酸素運搬小胞体同士の凝集、集合も認められず、均一の密度にて微小血管内を流れていることが認められている。

さらに問題となるのは流血内でのHbからmet-Hbへの変化である。生体動脈血液内の酸素分圧は一般に100mmHg以上である。したがって酸素運搬小胞体内のHbが次第にmet-Hbに酸化されていく。生理的な赤血球ではその細胞質内に還元酵素を有し、再びHbを再製している。しかし酸素運搬小胞体(Waseda: HbV)ではHbの精製過程においてこの酵素が除去されているのでFig. 1.¹⁸⁾に示すごとく時間経過とともにHbのほとんどがmet-Hbに転換されてしまう。一方Terumo社製 NRCでは酸素運搬小胞体内に上記の還元酵素は温存しているがこの酵素の活性保存機能が小胞体内に取り込まれていないため、HbV(Waseda)同様にHbからmet-Hbに酸化される結果を生じている¹⁹⁾。今後速やかにこの問題を解決する必要性がある。



Sakai, H., Takeoka, S., Tsuchida, E.
The project study of Japanese Ministry Health & Welfare
Reported on April 25 2002

Fig. 1. Retention Volume of HbV In plasma and metHb Content

3. 安全性

人工酸素運搬体は薬物として取り扱われる。したがって国が定めるGLPの基準²⁰⁾にもとづいて検討され、それに適合しなければならない。さらに現在わが国で開発されているものは、その酸素運搬機能をヒト赤血球から抽出したHbに依存している。そのため生物薬品(バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品)の安全性試験についての基準²¹⁾、International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human UseのTripartite Guideline²¹⁾にも適合しなければならない。そしてその試験計画に関しては生物薬品(バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品)の規格及び試験方法の設定²²⁾をふまえて計画されなければならない。とくに現在開発中の人工酸素運搬体に関しては以下の諸点の検討が必要と考えられる。

1) 研究対象・投与方法

(1) 研究対象動物種

小動物(マウス, ラット)での基礎的安全性試験をもとに、少なくとも2種類以上の中動物, 大動物(霊長類を含む)にて検討することが必要である。現時点まで生産面での制約からその使用量がきわめて限定されていた。そのため過去数年間の前臨床研究はほとんど小動物(マウス, ラット)で行なわれてきた。しかし酸素運搬小胞体の循環血液内からの消失動態¹⁴⁾で

みられるごとく, 小動物と中動物, 大動物との酸素運搬小胞体に対する生体反応は異なってくる。そのため試験計画に関しては生物薬品の規格及び試験方法の設定について^{21), 22)}に適合するためにも中動物, 大動物での検討が必要である。

(2) 研究動物数

一項目の生物学的安全性検討に関しては原則として統計学的有意差を得るに十分な数が必要である。すなわち一般的には5頭以上の動物数にて検討する。しかし実際問題として統計的に有意差を得なくても5-6頭の検討にて十分として判断される場合があり, さらに頭数を増やし検討することの必要性はその項目の生理学的意義, 臨床上の重要性を考慮すべきものと判断される。

(3) 投与方法

A. 単回投与にともなう生体反応・毒性試験

現在開発中の人工酸素運搬体の特性にかんがみ, まず10-20ml/kgの単回投与試験を行なう。さらに増量(40-100ml/kg)して生体の反応, 毒性の検討が要求される場合には, 生体から投与量と同量の脱血を行なう必要がある。すなわち今回の試験対象である酸素運搬小胞体は生理食塩水に浮遊させたものである。生理食塩水の30ml/kg・hの負荷はヒトを対象としても認むべき毒性を発揮しない¹⁵⁾。しかし酸素運搬小胞体それ自身の投与量は一般薬物の投与量(重量, 容積)に比較して大きく, さらにそれが短時間に生体組織・臓器に吸収され, そして排泄

Table 2. Vital Functions and Responses observed for Clinical Safety in Preclinical Study and Their Examination Methods

	First Step Test	Second Step Test
Release of Biologically Active Mediator	plasma leukotriene, histamine, serotonin	plasma IL-1, IL-6, IL-8, TNF, erythropoietin
Mental Activity, Behavior, Nerve Function	behavior & movement analysis	pain response, histology of nervous system
Muscle & Tendon Function	voluntary movement analysis	histological examination
Circulatory Function	arterial blood pressure, heart rate, CVP	cardiac output, vascular resistance, circulatory blood volume, vascular permeability, capillary density etc.
Respiratory Function	respiratory rate, minute volume, PaO ₂ , PaCO ₂ , SaO ₂	pulmonary shunt, dead space rate, airway resistance lung/thorax compliance
Tissue Oxygen Utilizing Index	mix. venous PO ₂ , SO ₂ , plasma lactate, L/P ratio	oxygen consumption
Routine Blood Chemistry	serum Na, K, Cl, Ca, Mg, pH, HCO ₃ , Ht, B.E.	
Blood Acid Base Balance	blood glucose, amylase, lipase, uric acid, BUN	
Liver Function	GOT, GPT, LDH, plasma albumin, cholesterol, serum ammonium, alkaline phosphatase, cholinesterase, bilirubin, urine urobilinogen	dye excretion test
Renal Function	routine urinalysis, serum creatinine, GFR	serum beta-2-microglobulin, urine N-acetylglucosamine
Digestive Function	food intake, feces test	stomach & intestine kymogram
Endocrine Function	serum renin activity, blood insulin level blood T ₃ , T ₄ , blood cortisol level	blood ADH level, aldosterone, ACTH
Hematopoietic Function	routine hematological test, leukocyte analysis	bone marrow histological examination
Blood Coagulation, Hemostatic & Fibrinolytic Function	bleeding time, platelet count, PT, APTT fibrinogen	platelet adhesiveness, platelet aggregation test TEG test, euglobulin lysis test, blood FDP, TAT test
Immune & Defense Function	antibody formation test, complement fixation test antigen-antibody complex test, RES function test	allergy· anaphylactic reaction test, Shwartzman test immunoglobulin, CD4/CD8
Reproductive Function	oophocyte, sperm analysis, birth rate	chromosome aberration analysis of sperm & oophocyte
HbV pharmacokinetic Analysis	indicator labelled HbV pharmacokinetic analysis	
HbV Tissue Retention	histological examination	
Tumorigenicity	neoplasma occurrence rate	
Teratogenicity	lymphocyte chromosome aberration analysis Ames test	

されるものでない。したがって一般的に循環血液量増加 (hypervolemia) の限界とされる循環血液量の28%²³⁾を容易に逸脱するためである。しかも人工酸素運搬体の主な臨床使用目的は出血に対する血液の補いであり、このような血液交換をともなう薬剤増量試験は必要であり、かならず施行すべき項目でもある。

B. 反復投与にともなう生体反応・毒性試験

連日投与、あるいは隔日投与を行なう場合、単回投与の場合と同様に投与にともなう循環血液量の増加それ自身が投与薬物の毒性とは別個に生体に影響を及ぼす。そのため現実的な反復投与試験としては

a) 10-20ml/kg・weekの投与を6-8回行なう。すなわち酸素運搬小胞体が循環血液内から90%以上消失したと思われる時間経過後に投与を反復するのが適切と思われる。

b) 短時間、すなわち24時間毎の反復投与にともなう生体反応、累積毒性反応の観察をあえて行なう場合、とくに生体の免疫機能への影響などを観察する場合においてはその投与量を0.1-0.5ml/kg・dayのごとく少量として観察するのが適正であると思われる。

c) 10ml/kg・dayの血液交換投与を毎日、あるいは隔日に数回行なうことは必ずしも可能とは思われないが、酸素運搬小胞体の生体内蓄積毒性を観察するための一つの選択肢であるかもしれない。

2) 観察生体機能

新薬としての人工酸素運搬体がいかなる毒性を現すか現在まったく未知であるため、観察すべき生体機能は特定のものに局限することなく、可能なかぎり広く検討するのが望ましい。その観察機能、ならびに具体的な検査方法はTable 2のごとくである。このTable 2.中の一次検査、二次検査の別は時間的、経済的な配慮から、もし一次検査において異常、あるいはその疑いが認められた場合に二次検査を行なうことが望ましいもの、あるいは容易に行ないうる場合での選択項目でもある。少なくとも一次検査の項目については GLP の基準において観察しなければならないものであろう。

前記1)の投与量、投与方法は前臨床試験により人工酸素運搬体の有効性、安全性が確立されて治験(Phase I)を施行する場合にも適応される。むしろ治験(Phase II)においてはTable 2.の項目中、検討できない、また検討の対象とすべきで

ないものも含まれる。

4. 治験計画の要点

治験(Phase I, Phase II), すなわち患者を対象とした治験においては前臨床試験において、また Phase II 治験において安全・毒性についてそれなりの情報が得られているためもっぱら薬物としての人工酸素運搬体の有効性を検証することになる。しかしながら被験者はそのための志願者ではなく、病態の治療を必要とする患者である。したがって志願者の場合のごとく予め計画されて人工酸素運搬体投与前の患者生体機能のデータを取得することが困難な場合もある。さらに余裕をもって治験に関する informed consent を得ることが困難な場合もある。したがって治験(Phase I, Phase II)の施行に当たっては特に以下の事項に留意して治験計画を作成しなければならない。

- 1) 確実な成績 (definite evidence) が得られる研究計画
- 2) 十分な倫理的手順をふまえた計画(特に適切な社会的監視、十分な時間的、また十分な治療環境下でのinformed consentを得るために)

- 1) 確実な成績 (definite evidence) が得られる研究計画
 - (1) 科学的に信頼される結果を得るためには適切な対照群、すなわち対照処置・治療群の設定が欠かすことができない。またそれらは倫理性の面から現在の医療として批判をうけるこのとのない治療法でなければならない。具体的に人工酸素運搬体使用に対する対照には輸血、あるいは代用血漿剤の投与が選択されよう。しかし人工酸素運搬体の開発の目的から輸血は対照治療として不適當である。また酸素運搬小胞体が生理食塩水浮遊物である点から晶質液の投与も対照治療として考えられるが、その安全性から適切とは言い難い¹⁵⁾。したがって生体の血漿膠質浸透圧を維持するために人工酸素運搬体の投与とともに代用血漿剤の投与が必要になろう。
 - (2) 人工酸素運搬体の投与前での生体機能、生理的諸因子に関するデータの確保は科学研究として不可欠である。しかしながら患者を対照とし、さらに適切なinformed consentの取得が必要とされることからいくつかの制約が加わることも避けられない。したがって対象患者の病状、治療操作を十分考慮した計画が必要となる。また次項にも関係して複雑な測定操作は倫理的配慮も困難にもさせる。

Table 3. Physiological Parameters for Measurement in Clinical Trial (Phase II)

Arterial Blood Pressure	Arterial O ₂ , CO ₂ Partial Pressure
Right Atrial Mean Pressure	Arterial pH, Base Excess, Lactate
Heart Rate	Routine Hemogram(including, HbVcrit)
ECG	Mixed Venous O ₂ , CO ₂ Partial Pressure
Urine Volume	Routine Urinalysis
Routine Blood Chemical Analysis	Routine Liver Function Test

(3) 生体機能, 生理的諸因子に関する測定項目は可及的少なく, かつそれらの測定操作は簡単, 一般臨床検査, あるいは日常行なわれる監視 (monitoring) 操作であることが要求される。これは測定者の技術的誤謬, 測定上のバラツキを少なくするために必要である。さらに測定者に時間的余裕を与え, より正確な成績を得るのに役立つ。また倫理的観点からも可及的的日常行なわれる監視操作に限定することが好ましい。

その具体的測定項目をTable 3.に提示した。各研究施設により研究用測定機器の調達状況は異なるが, 心電図, 観血的動脈圧測定, 中心静脈圧測定はいずれの施設においても可能と思われる。第一観察目標は人工酸素運搬体の使用による循環動態の安定, 末梢組織での十分な酸素代謝である。

(4) 対象患者は比較的病状が安定した患者とすべきである。これは病態に基づき測定因子への影響を除外し, 得られるデータのバラツキを少なくすることに役立つ。そして測定したデータをすべて有効に活用することになる。すなわち対象者が研究の途中で脱落することを防ぐことになる。

以上の条件を満足される具体的なPhase Ⅰ試験としては(a) 希釈式自己血輸血への応用, すなわち自己の血液を採取し, 循環血液量補充のために代用血漿剤に人工酸素運搬体液を加えて投与する。これを代用血漿剤単独使用の場合と比較する, あるいは(b) 体外循環使用心臓手術時の回路充填に一般晶質液の代わりに人工酸素運搬体液を使用し, 一般晶質液使用の場合と比較するなどの計画案などが現実的である。前者(a)はSpahnらの研究²⁾, あるいはGreenburgら²⁴⁾の研究とほぼ同様の計画である。

2) 十分な倫理的手順をふまえた計画

倫理的観点からPhase Ⅰの試験計画を検討する場合,(1) その試験が患者への処置, 治療であること,(2) その処置, 治療は現行の一般的なものと比較して, 患者に対してより効果的, 安全, あるいは経済的であること,(3) 適切なinformed consentの下に施行されること, の3点が配慮されることが必須である。人工酸素運搬体の使用は明かに処置, 治療として認められ, 同種血輸血に比較して効果的, 安全である。そして上記(a),(b)で示されたような試験計画であれば患者との十分な時間な話し合いでinformed consentを得ることが出来る。

5. 試験計画の監査

試験計画はその試験を施行する施設のIRB (Institutional Research Bureau), ならびにその施設が適切と認め構成された倫理委員会で監査され, 承認された試験計画でなければならない。すなわち試験に該当する部門の研究者のみで承認されたものであってはならない。また倫理委員会の構成も試験を施行する施設の職員のみでは適切でない。施設職員外の医学的専門家, ならびに医学関係者以外の有識者 (一般市民的立場の人) が構成メンバーに加わるべきである。むしろ試験を施行する施設は予想せざる緊急・救命事態に対処しうる設備, 環境, 職員構成を有することが必要である。

おわりに

人工酸素運搬体の開発で前臨床試験はかなり進み, 未解決の問題も早急に解消される状態にある。一方人工酸素運搬体に対する社会的な要求は緊迫した状態にまで達している。そのためさらに大きな, そして速やかな前進が, 人工酸素運搬体の開発研究にあることが望まれる。そしてこれをふまえて本稿において述べたことが実現化し, 役立つことを切望するものである。

本稿の要旨は平成16年7月12日札幌市においておこなわれた平成16年度厚生労働省科学研究 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業 人工赤血球の安全性向上に関する研究 (H15-医薬-016)) の公開発表会において発表した。またこの研究は同研究事業の補助研究費により支援された。

引用論文

1. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, Rodman G. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: A randomized controlled efficacy trial. JAMA 1999; 282: 1857-1864.
2. Spahn DR, van Breetm R, Theilmeier G, Reibold J-P, Welte M, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. Anesthesiology 1999; 91: 1195-1208.
3. Gawryl MS. Hemopure: Clinical development and experience. 人工血液 2003; 11: 46.
4. Huch R, Luebbers DW, Huch A. Quantitative continuous measurement of partial oxygen pressure on the skin of adults and new-born babies. Pflug Arch 1972; 337: 185-198.
5. Moss AJ. Intramyocardial oxygen tension. Cardiovasc Res 1968; 3: 314-318.
6. MacMillan V, Siesjö BK. Critical oxygen tensions in the brain. Acta physiol Scand 1971; 82: 412-414.
7. Khandelwal SR, Randad RS, Lin, P-S, Meng H, Pittman RN, Kontos H.A, Choi SC, Abraham DJ, Schmidt-Ullrich R. Enhanced oxygenation in vivo by allosteric inhibitors of hemoglobin saturation. Am J Physiol 1993; 265: H1450-H1453.
8. Kohzuki H, Enoki Y, Sakata S, Shimizu S, Ohga Y. High affinity of blood for oxygen reduces oxygen uptake in contracting canine gracilis muscle. Exp Physiol 1994; 79: 71-80.
9. Shappell SD, Murray JA, Nasser MG, Wills RE, Torrance JD, Lenfant CJM. Acute change in hemoglobin affinity for oxygen during angina pectoris. New Engl J Med. 1970; 282: 1219-1224.
10. Sakai H, Tsai AG, Rohlfes RJ, Hara H, Takeoka S,

- Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitute : Influence of O-2 affinity. *Am J Physiol* 1999 ; 45 : H553-H562.
- 11 . Takaori M, Safar P, Galla SJ. Changes in body fluid compartments during hemodilution with HES and dextran 40 *Arch Surg* 1970 ; 100 : 263-268.
 - 12 . 中山雅人, 小川重男, 高折益彦. 拡大血液希釈性自己輸血に関する研究. *日本輸血学会雑誌* 1984 ; 30 : 168-174.
 - 13 . Viele MK, Weiskopf RB. What can we learn about the need for transfusion from patients who refuse blood? The experience with Jehovah's Witnesses. *Transfusion* 1994 ; 34 : 396-401
 - 14 . 宗慶太郎, Klipper R, Goins B, Phillips WT, 土田英俊. ヘモグロビン小胞体の体内動態解析. *人工血液* 2004 ; 12 : 53.
 - 15 . 望月興弘, 古妻嘉一, 高折益彦. 細胞外液補給における低分子デキストラン, 乳酸化リンゲル液の意義. *新薬と臨床* 1970 ; 19 : 115-120.
 - 16 . Moss G. Fluid distribution in prevention of hypovolemic shock. *Arch Surg* 1969 ; 98 : 281-285.
 - 17 . Hoka S, Ozawa A, Nara Y. Effect of artificial oxygen carrier on neutrophil movement in the microvasculature of hamster cheek pouch. *人工血液* 2003 ; 11 : 67
 - 18 . 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊. 臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究 (厚生労働省医薬安全総合研究事業 研究課題番号: H12-医薬-009) 研究班会議 平成14年5月25日発表 東京.
 - 19 . 筒井洋治, 木村哲寛, 石塚隆伸, 大森伸二, 志澤隆, 後藤博, 緒方嘉貴, 金田伸一. ラットhemodilutionモデルにおけるNRC (Neo Red Cell) の効果持続性評価. *人工血液* 2002 ; 10 : 36-41.
 - 20 . 薬事審議研究会. GLP. 医薬品製造指針 じほう 東京 2001 pp 523-536.
 - 21 . 厚生省医薬安全局審査管理課長. 生物薬品 (バイオテクノロジー応用製品 / 生物起源由来製品) の安全性試験について. 厚生省医薬安全局審査会通達第6号 (平成10年1月6日)
 - 22 . 厚生省医薬安全局審査管理課長. 生物薬品 (バイオテクノロジー応用製品 / 生物起源由来製品) の規格及び試験方法の設定について. 厚生省医薬安全局審査会通達第571号 (平成13年5月1日)
 - 23 . Schnabel TG, Jr. Eliasch H, Thomasson B, Werkø L. The effect of experimentally induced hypervolemia on cardiac function in normal subjects and patients with mitral stenosis. *J Clin Invest* 1959 ; 38 : 117-137.
 - 24 . Greenburg AG, Kim HW. 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 Surgeons* 2004 ; 198 : 373-383.

細胞から血小板を作る

Production of platelets from cells in vitro.

藤元 貴啓

Tetsuro-Takahiro Fujimoto

和文抄録

造血前駆細胞からin vitroで巨核球を分化させる種々の方法が考案され、ヒト末梢血CD34陽性細胞からの血小板産生も報告されている。これらの研究の最終目標は血小板輸血の代替法などの臨床応用であるが、CD34陽性細胞は得られる細胞数が少なく、未分化のまま増幅させる方法がなく、十分な血小板数を産生させるためには限界がある。胚性幹細胞（ES細胞）は別の細胞源であり、増殖が非常に早いことより十分な細胞数が得られる可能性のある細胞である。マウスES細胞から、OP9間質細胞との共培養系を利用してin vitroで巨核球を分化させ、血小板を産生することが成功している。経時的に一次造血および二次造血を反映すると思われる巨核球及び血小板がES細胞から産生され、後者でより多くの血小板が培養上清中に見られ、最終的に 10^4 個のES細胞から 1.8×10^8 個の血小板が産生された。電顕的観察では、二次造血に由来する血小板は楕円状でよく発達した顆粒を有し、末梢血血小板と同様の形態を示していた。産生された血小板は、刺激に反応してフィブリノーゲンを結合し、凝集塊を形成し、放出反応を起こして表面にP-セレクトリンを発現し、さらに固相化フィブリノーゲン上で粘着伸展反応を起こすなどの機能を有していた。この方法で目的遺伝子を導入させたES細胞を分化させることにより遺伝子改変血小板を作成することも可能であった。臨床応用を考えるとヒトES細胞の利用が必要となるが、同様の手技でヒト血小板を産生することも可能と思われ、さらに将来的に個々の患者由来のクローンES細胞が利用可能となれば自己血小板による代替療法が可能かも知れない。

Abstract

Various culture systems demonstrating in vitro megakaryocyte maturation from hematopoietic progenitor cells have been described. Platelet production was also demonstrated from CD34-positive cells from human peripheral blood. Potential gains from these studies would be therapeutic applications, such as in transfusions. However, the number of obtained CD34 cells and the difficulties in expansion of these cells in vitro are factors that limit such strategies from being able to generate sufficient amounts of platelets. Embryonic stem (ES) cells are another good source since they can rapidly proliferate and might enable an unlimited supply of platelets. Megakaryocytes and functional platelets were generated in vitro from murine embryonic stem (ES) cells using a coculture system with OP9 stromal cells. Morphologically two distinctive megakaryocytes were observed sequentially, suggesting primitive and definitive megakaryopoiesis. Two waves of platelet production were consistently observed in the culture medium. A larger number of platelets was produced in the second wave; 10^4 ES cells produced up to 10^8 platelets. By transmission electron microscopy, platelets from the second were discoid shaped with well-developed granules that were indistinguishable from peripheral blood platelets. ES-derived platelets were functional since they bound fibrinogen, formed aggregates, expressed P-selectin upon stimulation, and fully spread on immobilized fibrinogen. Furthermore, production of gene-transferred platelets was achieved by differentiating ES cells that were transfected with genes of interest. For clinical purposes, the utility of human ES cells has advantages. Human platelets will possibly be generated from human ES cells in vitro by a similar approach. If in the future cloned ES cells were available from patients' somatic cells, platelets from such ES cells could be applied to autologous platelet transfusion.

Keywords

platelets, megakaryocytes, ES cells, platelet substitute

広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻病態薬物治療学講座血液・腫瘍学教室 〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3

Department of Hematology and Oncology, Division of Clinical Pharmacotherapeutics, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima

University 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8551, Japan

論文受付 2004年9月9日 受理日 2004年10月28日

1. in vitro血小板産生研究の背景

1) 血小板輸血の問題点

血小板輸血療法はがん化学療法や血小板減少症、機能異常症などの血液疾患などの治療として広く行われている。しかしながら、副作用や問題点も多く、まず輸血療法一般の問題として他人の血液であることから、不適合やアレルギーの発生、HLA抗体の出現による輸血不応症の発生や、肝炎ウイルス、HIVウイルスやその他未知のウイルスの感染が完全には回避できないことなどがあげられる。さらに血小板輸血特異的問題として、現行で行われている成分採血は長時間の対外循環を必要としドナーの負担が大きいこと、室温保存が必要で細菌繁殖の危険があること、保存期間が約3日と短く、常に製剤不足の危険が付きまとうことなどがあげられる。これらの問題点を克服すべく、多くの研究が行われており、たとえば最近、血小板の表面糖鎖を修飾することによって、血小板を低温、長期に保存することが可能であることが報告され¹⁾、簡便で有望な手段と考えられるが、実用化には至っていない。代替療法として人工血小板の開発も進められているが²⁾、未だ臨床応用の段階には至っていない。他の血小板減少に対する治療法としては、がん化学療法後の白血球減少症に対するG-CSF療法のようなサイトカイン療法としてトロンボポエチン(TPO)製剤が期待されていたが³⁾、血小板輸血が不必要になるわけではなく、輸血回数的大幅な減少にもつながらず、また予想外に抗TPO抗体の発生による深刻な血小板減少が見られる例もあり、開発が中断されたままとなっている。

2) 再生医学の発展

一方、近年in vitroで様々な細胞、組織を作りだし、再生医療として応用する試みが急速に進展している。再生医療とは、廃絶した生体の細胞、組織や臓器を、細胞を利用してその再生をはかる医療で、その研究分野が再生医学とも呼ばれる。再生医療は21世紀の新しい医療として、臓器移植、人工臓器、輸血などを過去の医療としてしまう可能性が期待されている。再生医学研究の発展の背景には、幹細胞の概念の確立、サイトカインなどの分化増殖因子の同定、細胞分化の足場となるフィーダー細胞やマトリックスの研究などの進歩があげられる。幹細胞とは自己複製能(Self-renewal)と分化能を有する細胞のことで、特に自己複製能のために、幹細胞は絶えることなく生涯にわたって目的の分化細胞を産生供給することができる。最近の研究では、成体内のほぼすべての細胞種、臓器にそれぞれ固有の幹細胞が存在し、骨髄中には造血幹細胞や間葉系幹細胞、血管幹細胞が存在する。そのほか、血液細胞と同様に絶えず細胞を供給する皮膚幹細胞、腸管粘膜幹細胞のほかに、肝幹細胞、膵幹細胞など臓器固有の幹細胞や、成人では再生することがないと考えられていた脳や神経系にも神経幹細胞が存在することなどが次々と明らかになっている。これら成体内に存在する幹細胞は一括して体性幹細胞あるいは組織幹細胞と呼ばれ、これらの細胞を単離して応用する試みが行われている。造血幹細胞を回収して、治療に応用する方法は、既に骨髄移植などの造血

幹細胞移植として臨床応用されているが、さらに進んで、これら生体幹細胞をin vitroで分化させた後に生体内に戻してやれば、それぞれの細胞に対応する臓器の再生も可能になると思われる。このような発想のもと、造血幹細胞からin vitroで成熟血球を産生できれば、輸血の代替療法として利用でき、将来的には工場で大量生産できれば、現在の献血制度が不要となることなども想定されている。

しかしながら、体性幹細胞利用の問題点は、これらの細胞が生体内にわずかしか存在せず、単離が困難であること、単離できてもin vitroでの増殖が難しい、すなわち未分化幹細胞のまま増幅させる技術(Stem Cell Expansion)が確立していないことである。したがって現時点では、幹細胞源として、体性幹細胞以外の細胞として胚性幹細胞の利用を行う方が有利であると考えられる。胚性幹細胞とはES(Embryonic Stem)細胞とも呼ばれ、受精卵の胚盤胞(Blastocyst)の段階に見られる、将来生体となる内部細胞塊(Inner Cell Mass)より樹立された細胞株のことで、フィーダー細胞(胚性線維芽細胞、STO細胞など)と、サイトカインであるLIF(Leukemia Inhibitory Factor)の存在下に未分化のまま増殖でき(自己複製能)、あらゆる種類の細胞に分化する全能性、多分化能を有する細胞である。ES細胞を利用する最大の利点は、増殖が容易で増殖速度が極めて速く、大量の細胞から開始できることであり、さらに遺伝子操作が容易であり、遺伝子治療と組み合わせた治療法も可能であることが挙げられる⁴⁾。一方で、受精卵に入れ子宮に戻すと生体となる、そのまま生体に移植すると腫瘍(胚性細胞種)となるなどの危険性も有している。これまで、マウスES細胞からin vitroでの分化が可能となったものとして、血液細胞(赤血球、単球、B細胞)⁵⁾、血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞、ドーパミン産生細胞、末梢神経細胞、インスリン分泌細胞など種々のものが報告されている。このような背景のもと、我々はマウスES細胞からin vitroで機能的血小板を産生させることに成功した⁶⁾。

2. 骨髄での巨核球分化と血小板産生

in vitroでの血小板産生を効率よく起こさせるためには、骨髄での血小板前駆細胞である巨核球の分化と血小板産生機構を理解し、それに近い状態を再現することが必要と考えられる。Fig. 1に示すように、骨髄で造血幹細胞が巨核球系細胞へと分化を始めると、巨核芽球、前巨核球、巨核球と分化成熟し、それに伴い、多核化、顆粒の増生などの細胞質の成熟が起こり、巨大化する。これらの過程で最も重要なサイトカインがTPOであり、強力に巨核球の増殖、分化、成熟を誘導する³⁾。IL-6、IL-11も弱いながらも同様の作用を有している。IL-3、SCFなどは初期の分化に作用するが、これらは巨核球特異的ではなく、白血球、赤血球系にも作用する。十分に成熟した巨核球は、最終段階で大きな形態変化を遂げてその細胞質が血小板へと変化する。すなわち胞体突起あるいはプロプレートット(PPF:proplatelet)と呼ばれる無数の突起を伸展させる(Fig. 2)。細胞内骨格蛋白系ではチュプリンの重合がこのPPF形成に大き

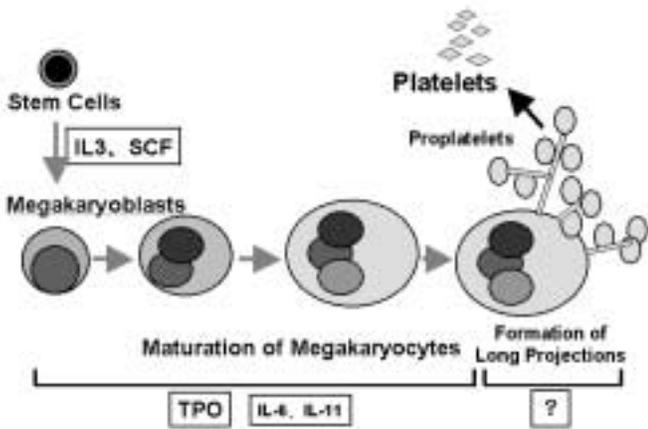


Fig. 1. 巨核球、血小板の分化過程

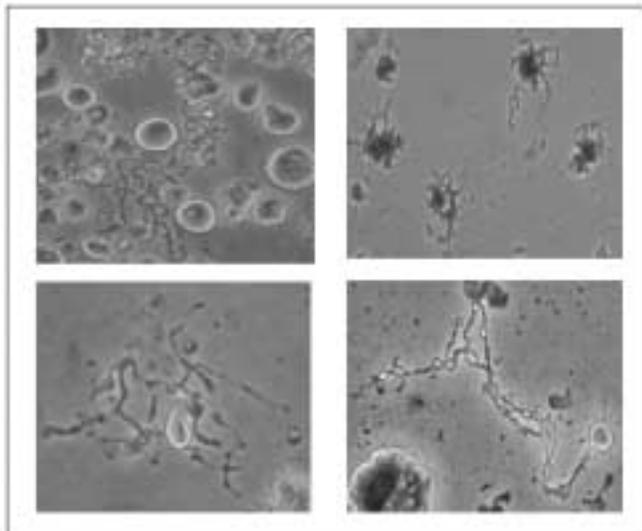


Fig. 2. ヒト末梢血CD34陽性細胞からのProplatelet形成 (400倍)

くかかっており、巨核球の細胞質から血小板形成に必要な内容物がこのチューリンに沿って、突起の先端まで運ばれ、その先端が血小板として次々と放出される⁷⁾。したがってin vitroで巨核球分化を経て血小板を産生させる場合にも、このPPF形成という形態変化を起こさせることが必須の条件となる。PPF形成の機序については不明点が多く、SDF-1などPPF形成に促進的に働く因子は知られているが⁸⁾、PPF形成の引き金となる決定的な外来因子は現在のところ不明である。PPF形成ではアポトーシスに関係する細胞内シグナルが働いているとされが、少なくともTPOは巨核球の増殖刺激のみであり、アポトーシスを抑制しPPF形成にも抑制的に働く (Fig. 3B)。PPF形成については、実際の骨髓標本では捉えられることがほとんどなく、PPF形成という形態変化はin vitroのみの現象で、骨髓内では細胞質に分離膜が形成されて、爆発的に血小板へと分割されるとの説もある。しかしながら、電顕像では巨核球からのPPFが、類洞と呼ばれる骨髓内血管の内腔に突出する像が捕らえられ、また最近、TPOノックアウトマウスなどの特殊な条件下では、残存する巨核球のほとんどが類洞周囲に集ぞくし、PPFを類洞内に伸ばしているとの報告もあり⁹⁾、巨核球は分化の最終段階

では、骨髓内に血小板を放出するのではなく、血管内にPPFを伸ばして血小板を流血中に放出するものと考えられる。これに対して造血幹細胞は骨組織周囲にニッチを形成して存在することが知られており⁹⁾、両者を考え合わせると、骨髓内では骨組織の辺縁から血管へ向けた一定の方向性を持って巨核球の分化が進み、巨核球もそれに合わせて移動することが予想される。足場となるフィーダー細胞としては、造血幹細胞では特殊な骨芽細胞、SNO (Spindle-shapes N-cadherin+ osteoblast) 細胞とされ⁹⁾、PPF形成時には血管内皮細胞が考えられるが、その中間段階ではいくつかの骨髓間質細胞がかかっていると思われるものの、それらの詳細は不明である。

3. 細胞を用いた巨核球分化と血小板産生

1) 生体幹細胞 (造血幹細胞) からの巨核球分化と血小板産生

巨核球研究によく用いられている巨核球系細胞株は、巨核球性白血病由来の細胞で、不死化し、常に増殖を繰り返す細胞であり、生体内の巨核球のように血小板を産生して死んでゆく細胞は今のところ見つかっていない。一部に巨核球系細胞株でPPF産生を観察したとの報告もあるが、フィロポディアなどの細胞接着に關与する細胞質突起との混同が多く、少なくとも血小板産生の細胞源としては使用できない。

ヒトCD34陽性細胞は厳密な意味での造血幹細胞とは異なるが、生体幹細胞としてin vitroでの巨核球分化を行った研究が数多く報告されている^{10,11)}。分化誘導の方法は液体培養、骨髓間質細胞との共培養などさまざまであるが、いずれもポイントは外来性にTPOを加えることである。CD34陽性細胞のソースとしても、骨髓、末梢血および臍帯血があり、臍帯血由来のCD34陽性細胞からは小型の巨核球が比較的早期にPPFを産生するのに対して、骨髓および末梢血の細胞からは大型、多核の成人骨髓の巨核球に近い形態の巨核球がより長時間を経て産生される傾向にあるが (Fig. 3C)、いずれも比較的容易にPPF産生までは観察される。この場合、添加するサイトカインとしてはTPOに加えて種々の組み合わせが報告されているが、IL3、IL6などとの組み合わせで、産生される細胞数は増加するが、

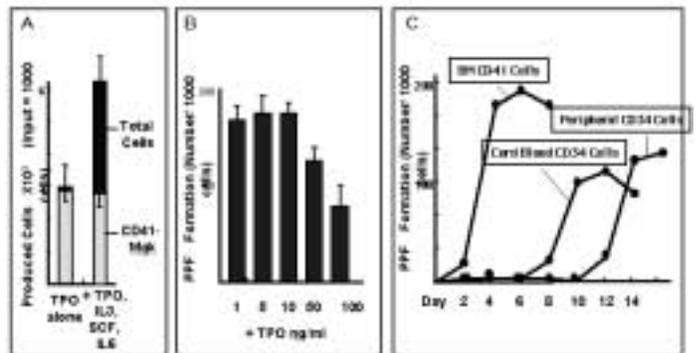


Fig. 3. CD34陽性細胞からのPPF形成の条件検討

A: TPO単独とTPOに各種サイトカインを混合添加した場合の巨核球産生数。巨核球はCD41陽性細胞として計測した¹¹⁾。B: TPO濃度と最終的に観察されるPPF形成細胞数。C: 臍帯血および末梢血CD34細胞からのPPF形成の経時的変化。PPF産生数は既報に従い²⁴⁾液体培養下でPPFをカウントした。

巨核球以外の細胞種も同時に産生されるのみで、巨核球の純度はTPO単独が最も高く、結果的に巨核球の総数は変わらないようである (Fig. 3A)。また前述のようにTPO濃度は高濃度になるとむしろPPFの産生を抑制し、10ng/ml以下の低濃度のほうが効率よくPPFを形成させ血小板産生にも有利であり (Fig. 3B)、これらの結果は以下のES細胞の分化に対しても同様であった。

Choiらは¹²⁾、ヒト末梢血CD34陽性細胞を用いた液体培養で、培養8から11日目までにPPF形成巨核球を産生させ、その培養上清に血小板が産生されることを報告している。これらの血小板は顕微鏡でもほぼ末梢血血小板と同等で、さらにトロンピンやADPなどのアゴニストで凝集塊を形成することも示されている。このようにCD34陽性細胞からの血小板産生は非常に有力な方法であるが、大きな問題点は得られる細胞数が限られることであり、我々の検討でも、ヒト末梢血200mlから平均5千から1万個のCD34陽性細胞が得られるのみで、血小板産生の基礎研究に利用できる程度であった。CD34陽性細胞を未分化なまま *in vitro* で増幅させる技術の開発が待たれる。

2) ES細胞からの血小板産生

ES細胞を利用する大きな利点は、増殖が非常に早く、大量の細胞から分化を開始できる点であり、たとえば2から3日で未分化なまま約100倍に増殖可能である。一般的にES細胞の分化誘導法としては、まず未分化維持のためのフィーダー細胞とLIFを除去し、その後に胚様細胞塊 (Embryoid body) を形成させる方法、間質細胞と共培養する方法、マトリックス上で培養する方法など種々の方法が考案されている^{4,5,13,14)}。血球系細胞への分化法としては液体培養でEmbryoid bodyを形成させる方法もよく行われるが、この場合は種々の系統の細胞が同時に産生され、巨核球系などある一定の細胞種のみへの分化は困難である。

そこで我々はES細胞を骨髄間質細胞株OP9細胞 (大阪大学仲野徹教授より供与) と共培養する系を応用した (Fig. 4)^{5,15)}。OP9細胞は、大理石病マウス (*OP⁻/OP⁻*) 由来の骨髄間質細胞で、M-CSF (マクロファージコロニー刺激因子) を欠損する細胞で、他の各種造血サイトカインを産生し、血球系への分化を誘

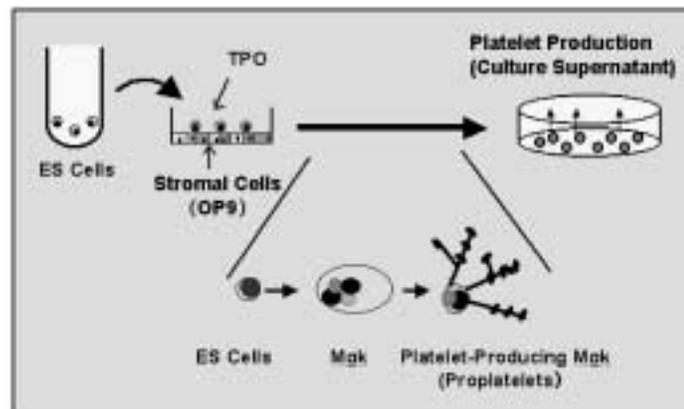


Fig. 4. ES細胞からの *in vitro* 血小板産生法の概略

導することが知られている。OP9以外の骨髄間質細胞でも分化は可能であるが、ほとんどの場合M-CSFの過剰産生のためか単球やマクロファージのみが分化してくる。これまでOP9細胞を用いて赤血球、B細胞などの血球への分化が報告されており^{5,15)}、さらにOP9上での心筋、血管内皮、神経、膵島細胞等への分化も誘導可能なことも知られている。実際の方法としては、ES細胞をOP9の細胞層の上で培養し、約5日で造血前駆細胞塊に変化させ、その後に新しいOP9に撒きなおし、そこからTPOを加えて巨核球への分化誘導を行った。サイトカインとしてはCD34細胞の経験から、低濃度TPO (10ng/ml) 単独存在下がやはり最も純度よく巨核球を分化させ、後のPPF産生に有利であった。またマウスES細胞株についてもいくつかの細胞を試したが、C57B2/6メスマウスとCBAオスマウスのF1胚から樹立されたTT2細胞¹⁶⁾が最も多くの巨核球を産生した。理由は良く分からないが、たとえば多くのES細胞は胚盤胞に入れキメラマウスを作成するが、TT2細胞は胚盤胞よりも8細胞胚に入れたほうが効率よくキメラマウスを作成できるなど、ES細胞の中にも、それぞれ性格の違いが指摘されており、何らかの要因が巨核球への分化の程度に影響を及ぼしていると考えられる。

以上の方法でES細胞の培養を継続すると、Fig. 5に示すように、5日目までに未分化ES細胞コロニーとは異なり辺縁が不明瞭でやや崩れた感じの造血前駆細胞コロニーが出現し、約8日目以降より、ES細胞よりは大型で個々の細胞が明確となるコロニーが出現する。これらの細胞は抗血小板特異抗原CD41 (GP b-a 複合体) を用いた免疫染色、およびアセチルコリンエステラーゼ染色のいずれも陽性で巨核球コロニーであることが確認でき、ライト染色などでの形態観察でも骨髄巨核球とほぼ同様の細胞が見られるようになる。これらの大型細胞は経時的にコロニーの外に向かって移動し、辺縁部では間質細胞との接着性が低下し一部に上清中に浮遊し始める傾向も観察された。

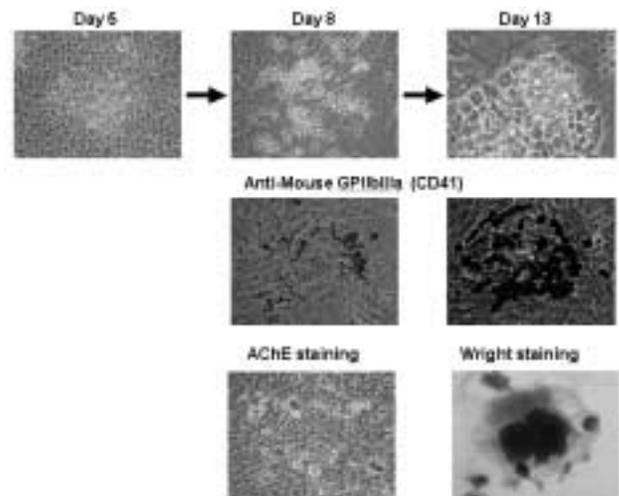


Fig. 5. ES細胞から巨核球への分化

上段に位相差顕微鏡像、中段に抗CD41免疫染色像を示す。(5および8日目は100倍、13日目は200倍) 下段は13日目のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 染色 (100倍)、ライト染色 (600倍)。

詳細に検討すると、経時的に二種の分化コロニーが観察され、8日目頃にはサイズの小さな巨核球が早期からPPFを形成し、13日目以降からはより大型の巨核球が確認された (Fig. 6). 前者はDNA量も8Nまでであり多核とならないままであり、後者は骨髓巨核球と同様の多核化が見られた。これらの現象は、胎児期に見られる一次造血、二次造血に相当する二種の分化の再現と考えられ、ES細胞からの赤血球分化でも同様の現象が報告されている¹⁵⁾。赤血球の場合はヘモグロビン型によってその証明がなされるが、巨核球の場合は一次、二次造血を区別するマーカーは今のところ知られていない。しかしながらES細胞からの巨核球ではCD41免疫染色やアセチルコリンエステラーゼ染色など二次造血のほうがより染色性が強く、成人巨核球に一致するものと考えられる。

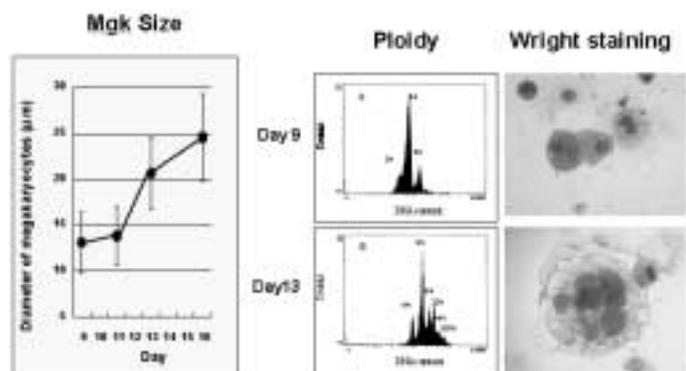


Fig. 6. ES細胞由来一次 (9日目) 二次造血巨核球 (13日目) の比較
巨核球サイズは既報のとおり⁶⁾、CD41巨核球と正常ヒト赤血球標本を等倍率 (400倍) で写真撮影し、赤血球の平均直径を7 μmとして算出した。巨核球ploidyはPI染色後のフローサイトメーターの結果を示す。ライト染色は400倍。

二次造血巨核球では、その後の血小板産生のためPPF形成が、培養約13日目以降に起こり、そのころになるとOP9細胞の過増殖などのためか培養の維持が困難となることが多い。実際ES細胞を巨核球に分化させた報告はこれまでもいくつかあるが^{17,18)}、約12日目までの観察しかなされず、産生された血小板については報告されていなかった。我々はOP9をマイトマイシン処理あるいは放射線処理するなどの工夫を行い、PPFを産生させることができ (Fig. 7), さらに血小板産生に合わせて凝集抑制剤を加え、最終的に培養上清中に血小板の産生を確認した。産生された血小板はフローサイトメーターでほぼ末梢血血小板と同じゲート内にあり、CD41やGPVなどの血小板特異的マーカーが陽性であった。経時的に血小板産生にも一次、二次造血に相当する二つのピークが観察され、13日目以降のほうがより多くの血小板を産生し、最終的に10⁴個のES細胞から1.8X10⁶個の血小板が産生された (Fig. 8)。これらES細胞由来血小板の電顕的観察では、一次造血血小板がより円形で少ない顆粒を有していたのに対して、二次造血に由来する血小板は、やや大型ではあるが楕円状 (Discoid shape) でよく発達した血小板特有の顆粒を豊富に有し、末梢血血小板と同様の形態を示していた (Fig. 9)。

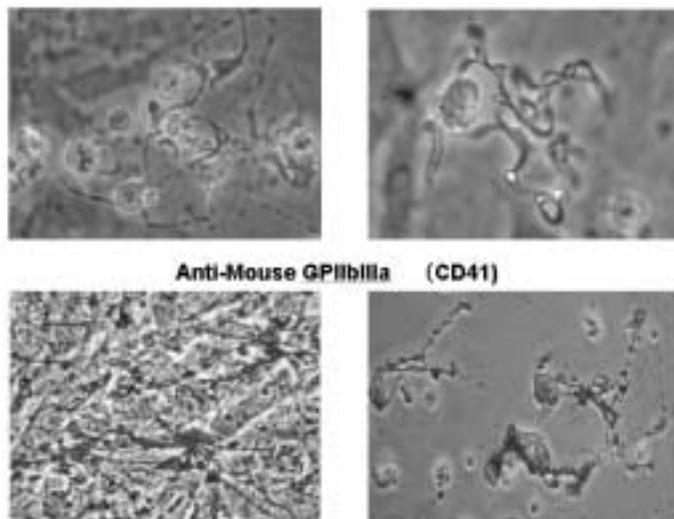


Fig. 7. ES細胞から分化しPPFを形成して血小板を産生する直前の巨核球 (400倍)
下段の免疫染色ではPPFの先端までCD41陽性である。

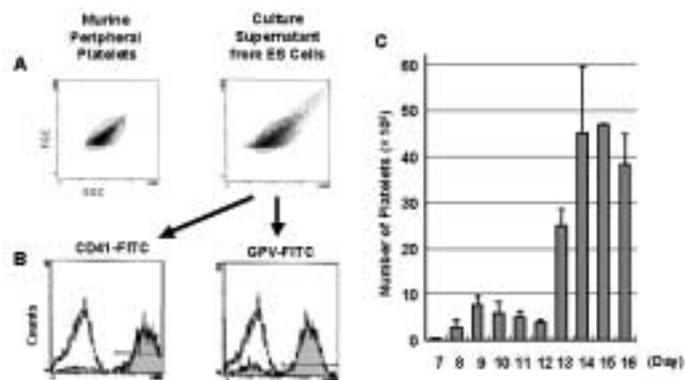


Fig. 8. ES細胞の培養上清中への血小板産生
A:ES細胞由来血小板はマウス末梢血血小板と同じ大きさで、B:CD41、GPVなどの血小板特異抗原陽性であった。Cには産生された血小板数の経時変化を示す。

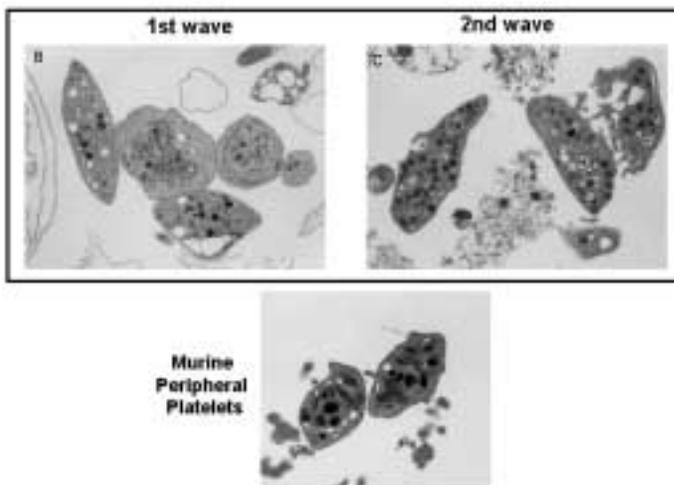


Fig. 9. ES細胞由来血小板の形態 (透過型電顕像)
下段にはコントロールとしてマウス末梢血血小板の像を示す。

これら産生された血小板の機能解析では (Fig. 10), トロンピンアゴニストペプチド (AYPGFK) やADPなどの刺激に反応してフィブリノーゲンを結合し, 凝集塊を形成し, 放出反応を起こして表面にP-セレクチンを発現し, さらに固相化フィブリノーゲン上で粘着伸展反応を起こすなど, 末梢血血小板に匹敵する機能を有していた。

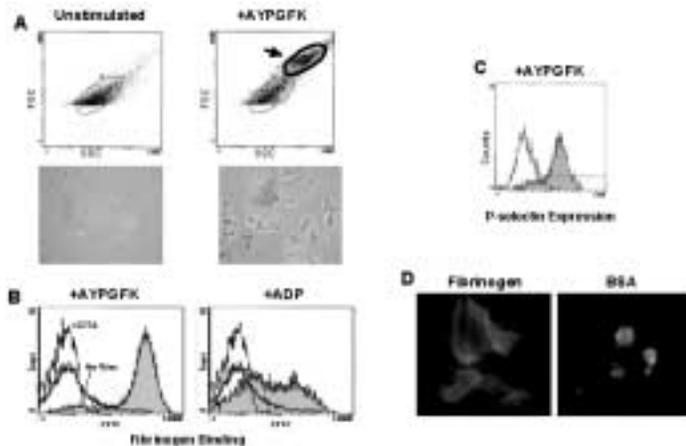


Fig. 10. ES細胞由来血小板の機能解析
 A: ES由来血小板はADPやトロンピン受容体アゴニスト (AYPGFK) に反応して凝集塊を形成し (600倍) B: フィブリノーゲンを結合, C: P-セレクチンを発現した。またD: 固相化フィブリノーゲン上で粘着伸展反応を示した (1000倍)。

この方法を利用して, 遺伝子導入血小板を産生させることも可能であり, GFP遺伝子をES細胞に導入し, 分化させたところ, GFP陽性の巨核球, PPF, 血小板を産生することが出来た (Fig. 11)。また巨核球血小板特異的プロモーターであるPF4プロモーターにGFP遺伝子をリンクさせることにより, 分化した巨核球や血小板のみに目的遺伝子を発現させる系も可能であった。さらに機能改変血小板のモデルとして, 人工的にインテグリン α_3 の細胞内ドメインを過剰発現させた血小板を作成した。インテグリン α_3 細胞内ドメインの過剰発現により, おそらく

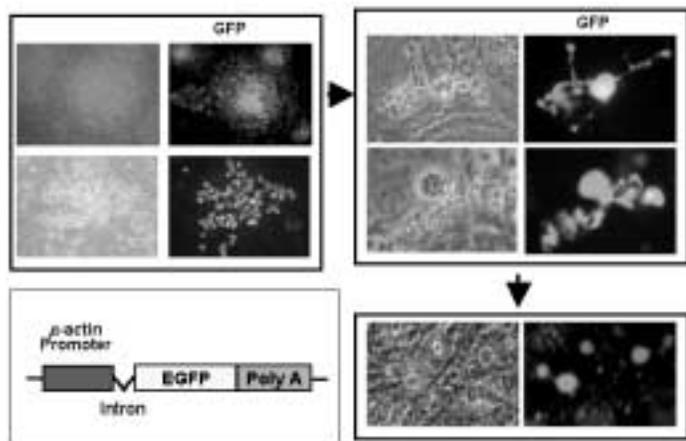


Fig. 11. GFP遺伝子を導入した緑色巨核球および血小板の産生
 左段は初期コロニー (100倍) 右段はPPF産生巨核球 (400倍) その下に巨核球周囲の産生された血小板を示し (400倍) いずれもGFP陽性である。

細胞内の何らかの情報伝達分子を拮抗阻害することにより, 血小板フィブリノーゲン受容体であるGPIIb-IIIa複合体 ($\alpha_{IIb}\beta_3$) が活性化できなくなるなどの機能抑制が引き起こされることがCHO細胞などの培養細胞で証明されていたが¹⁹⁾, 血小板での証明はなされていなかった。インテグリン α_3 の細胞内ドメインを過剰発現させたES細胞由来の血小板では, 刺激後のフィブリノーゲン結合が著明に低下した。従って, 目的の遺伝子を導入したES細胞から血小板を作成することで, 遺伝子機能の解析が可能であり, 同時に機能改変血小板を自由に作成することが可能であることを証明した。

4. 今後の展開

以上, OP9細胞との共培養系を利用したES細胞からのin vitro血小板産生法を概説し, 二次造血からの血小板が形態, 機能とも末梢血血小板に匹敵するもので, 種々の応用が可能であることを示した。しかしながら, 本研究は臨床応用への第一歩に過ぎない。将来的な輸血代替療法などへの応用を考えると, 実際に輸血に必要な血小板数からは程遠く, より安定した大量産生系を確立する必要がある。OP9システムの問題点として, 細胞の培養状態に大きく影響され, 時に分化がコントロールできず, 心筋細胞や神経細胞など, 目的以外の細胞系への分化が止められないことがしばしば経験され, まだまだ効率が悪く, 熟練を要する手法と思われる。現時点ではOP9細胞の何が効いているかも不明である。少なくとも細胞間の接着が重要であって, OP9の培養上清のみでは全く分化が進まないことから, サイトカインなどの液性因子ではなく, 細胞表面の接着分子が何らかの作用を有していると考えられる。従ってOP9に発現しES細胞との相互作用に関与する分子を同定する試みも行われている²⁰⁾。将来的には細胞を利用した分化系から脱却し, 必須の蛋白のみをリコンビナント蛋白の形で培養に利用するような系へと発展させ, 常に100%の細胞を1つの細胞種に分化させ, 産生効率の向上, 普遍性の確保を目指す必要が考えられる。一方で, 産生された血小板の多くはOP9細胞層に付着して観察されることから, 血小板の回収率にも改善の余地が残っていると思われる。実際の生体内では流速のある血流内に血小板が非活性化状態で放出されることが考えられる事から, 血小板放出を促進する分子を同定し利用することも含めて, 分化最終段階での血小板放出の条件を改善すれば, さらに産生効率の改善がはかれるものと思われる。

別の問題点として, 現在の血小板産生系は, 培養期間約2週間で血小板産生を終了し細胞が死に絶えてしまう, いわば一過性の系である。従って継続的な血小板産生系を構築する必要も考えられる。これにはOP9システムでの分化は生体幹細胞 (造血幹細胞) を経由しないのではないかと問題が存在し, たとえば培養5日目までの造血幹細胞を生体マウスに移植しても造血能の再構築が見られない。しかしながら最近, HoxB4を過剰発現したES細胞や, Bim-1, Wnt 3などを加えた系でin vitroで造血幹細胞が産生されるなどの報告があり²¹⁾, これらの候補遺伝子を導入したES細胞を利用すればin vitroで常に自己

複製と分化を繰り返し、継続的な血小板産生系が構築できる可能性も考えられる。

臨床応用を考えた場合のもう一つの方向性としては、少量ながらも機能改変血小板を細胞療法の一つとして利用する方法が考えられる。たとえば、前述の人工的にインテグリン 3の細胞内ドメインを過剰発現させて凝集能を低下させた血小板や、あるいはプラスミノゲンアクチベーター²²⁾など線溶系の蛋白を過剰に発現させたES由来血小板を生体内に投与すれば、血管内では血小板の機能としての接着反応などの機能は保持していることから、血栓形成部位に効率的に集積するものの、その後の血栓増大を阻害、あるいは血栓溶解を効率的に引き起こし、人工的な「抗血栓性血小板」あるいは「血栓溶解性血小板」として抗血栓療法へと発展することも予想され検討中である。

その他、基礎研究への応用として遺伝子導入実験が不可能な血小板の代わりにES由来血小板を利用した目的遺伝子の機能解析、十分な量が入手困難な骨髄細胞の代わりとして巨核球分化機構の解析、血小板増加薬の薬効解析への利用など応用範囲は広いと思われる。

さて、ES細胞からの血小板産生は、現在のところマウスES細胞を用いて成功している。将来的な臨床応用を考えると、次の段階はヒトES細胞の利用が必須であり、よくマウスで成功したのならヒトでも可能であると安易に考えられがちである。実際ヒトES細胞から、やはり間質細胞との共培養を利用してin vitroで巨核球を含めて各種血球細胞への分化を行った報告も見られ²³⁾、技術的にはマウスでの方法が応用可能と考えられる。しかしながら、ヒトES細胞の利用については技術的な問題以外の社会的、生命倫理的問題が存在する。すなわち、ヒトES細胞は本来ヒトになるはずの受精卵を破壊して作成される細胞株であること、受精卵はその由来となる父親の体細胞の一部でも、母親のものでもなく、遺伝型からするとこの世に唯一つしか存在しない細胞であり、誰から利用にあたっての同意を得るべきか、ヒトES細胞を受精卵に入れて子宮内に入れればヒトになる可能性があるなど、他の研究用の細胞株とは大きく性格の異なる細胞である。ヒト初期胚とはいえ細胞の集合にすぎないと考えれば、医療への貢献は計り知れないものがあり、積極的に利用すべきであるが、ヒト初期胚は我々人間と変わらない存在であると考えれば、胎児を切り刻んで患者を助ける治療が正しいかという極端な反対意見となり、安易に解決できる問題ではない。これについて、ヒトES細胞に関する指針が、文部科学省ガイドラインとして出されており、罰則は無いが現時点ではこれに従って研究を進める必要がある。ヒトES細胞は1998年にアメリカで初の樹立に成功し、その後、イギリス、オーストラリアでも成功している。日本ではガイドラインにのっとり唯一京都大学再生医学研究所で2003年にヒトES細胞が樹立された。これらヒトES細胞の使用に当たっては、他の細胞と異なり、尊厳を持って扱うことがうたわれ、使用機関、施設、設備、実績や実験計画、保存や廃棄方法など厳しい条件が付けられ、医療の発展につながる基礎的研究に限定され、現時点ではヒトへの移植による臨床研究も認められていない。海外

から輸入した細胞も含めて、研究機関内倫理審査委員会と文部科学省で審査承認された研究のみが実施可能で、国内でのすべての研究が文部科学省のホームページで公開されている。従って現時点ではES細胞からの血小板産生についても、ヒト以外のES細胞での研究成果を積み重ねていくことが重要であると思われる。

同様の状況が、クローン胚からのES細胞の利用についても言える。クローン羊ドリーが1997年に成功して以来、マウス、ネコ、サル、ウシなど多くの動物での成功が報告されている。クローン人間については一時報道をにぎわしたが疑問視されているが、ヒトクローン胚からのES細胞は既に報告されている。個々の患者からの治療用にクローン胚を作成し、そこからES細胞ができれば、血液細胞を含めて理想的な治療用細胞や移植用臓器のソースとなりうる。マウスなどの実験動物ですでにこのようなクローン胚由来のES細胞を利用した遺伝子治療の成功も報告されている。しかしながらヒトクローン胚の作成は、クローン人間誕生の危険性を有した技術であり、現時点ではクローン規制法（ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律）によって、ヒトクローン胚作りは許可されておらず、違反した場合には厳しい罰則も伴うようになっている。

ES細胞からの血球産生法は、これら種々の問題点が乗り越えられれば、将来、血液型やHLA抗原を消去したES細胞や、クローン胚由来ES細胞を含めた治療用ヒトES細胞バンクなどを利用して、工場での血液製剤の製造など、現在の輸血療法を大きく変える夢のある手法と思われる。

参考文献

1. Hoffmeister KM, Josefsson EC, Isaac NA, Clausen H, Hartwig JH, Stossel TP. Glycosylation restores survival of chilled blood platelets. *Science* 2003;301:1531-1534.
2. 長谷川雄一, 長澤俊郎. 人工血小板の開発の歴史と現状. *人工血液* 2003;11:193-199.
3. Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med* 1998;339:746-754.
4. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:862-869.
5. Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 1994;265:1098-1101.
6. Fujimoto TT, Kohata S, Suzuki H, Miyazaki H, Fujimura K. Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells in vitro. *Blood*. 2003;102:4044-4051.
7. Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999;147:1299-1312.
8. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with

- the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004;10:64-71.
9. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425:836-841.
 10. Guerriero R, Testa U, Gabbianelli M, et al. Unilineage megakaryocytic proliferation and differentiation of purified hematopoietic progenitors in serum-free liquid culture. *Blood* 1995;86:3725-3736.
 11. Hagiwara T, Kodama I, Horie K, Kato T, Miyazaki H. Proliferative properties of human umbilical cord blood megakaryocyte progenitor cells to human thrombopoietin. *Exp Hematol* 1998;26:228-235.
 12. Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995;85:402-413.
 13. Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 1993;13:473-486.
 14. Palacios R, Golunski E, Samaridis J. In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7530-7534.
 15. Nakano T, Kodama H, Honjo T. In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science* 1996;272:722-724.
 16. Yagi T, Tokunaga T, Furuta Y, et al. A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem* 1993;214:70-76.
 17. Era T, Takagi T, Takahashi T, Bories JC, Nakano T. Characterization of hematopoietic lineage-specific gene expression by ES cell in vitro differentiation induction system. *Blood* 2000;95:870-878.
 18. Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, et al. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12819-12824.
 19. Chen YP, O'Toole TE, Shipley T, et al. "Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 1994;269:18307-18310.
 20. Ueno H, Sakita-Ishikawa M, Morikawa Y, Nakano T, Kitamura T, Saito M. A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2003;4:457-463.
 21. Kyba M, Perlingeiro RCR, Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 2002;109:29-37.
 22. Kufrin D, Eslin DE, Bdeir K, Murciano JC, Kuo A, Kowalska MA, Degen JL, Sachais BS, Cines DB, Poncz M. Antithrombotic thrombocytes: ectopic expression of urokinase-type plasminogen activator in platelets. *Blood* 2003;102:926-933.
 23. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10716-10721.
 24. Horie K, Miyazaki H, Hagiwara T, Tahara E, Matsumoto A, Kadoya T, Ogami K, Kato T. Action of thrombopoietin at the megakaryocyte progenitor level is critical for the subsequent proplatelet production. *Exp Hematol* 1997;25:169-176.

血小板と血小板代替物の微視的運動のバイオメカニクス

Biomechanics of microscopic-motion of platelet and its substitute in the blood flow

藤田英輝*, 谷下一夫**

Hideki Fujita*, Kazuo Tanishita**

和文抄録

血小板は血流中では血管壁近くで濃度が最大となる分布をしており、この特異な濃度分布が止血過程に必須であることが知られている。この特異な濃度分布は赤血球の存在と深く関わっていることが実験的に明らかになっており、赤血球の微視的な運動との関連で血小板が血管壁に粘着して止血機能を果たしている。従って人工血小板を実用化させるためには、血小板の微視的運動のダイナミクスを人工血小板によって再現することが必要であり、血小板を模擬した微粒子の運動解析の結果について概観する。

Abstract

The concentration of platelet becomes maximum near the vessel wall in the blood flow and this is referred to as the "Near Wall Excess NWE". This excessive concentration of platelet near the wall plays a major role for the hemostasis process and this concentration occurs by the repetitive interaction with red blood cells. In order to make the clinical application of artificial platelet successful, we need to know the microscopic motion of platelet or its substitute in the blood flow and to explore the way how to achieve the NWE of platelet. In this review, we will have a literature survey of the previous studies on the microscopic motion of platelet.

Keywords

Platelet, Red Blood Cell, Blood Flow, Hemostasis, Artificial Platelet

1. はじめに

血小板の止血機構は、生化学現象であると同時に物理現象であり、血小板の微視的な運動が統合された結果として生じている。従って、血小板の止血機構を明らかにするためには、血小板表面に出現している種々の糖タンパクの粘着性の生化学的な側面と同時に血小板の微視的な運動と凝集過程という物理的な側面を明らかにすることが極めて重要である。近年、人工血小板の実用化が臨床医学の分野で要望されているが、臨床応用可能な人工血小板をデザインするためにも人工血小板の微視的な振る舞いを解析することが重要となる。そこで、本稿では、血小板及び人工血小板の血流中での微視的な振る舞いに関して、これまでの研究成果を概観する。

2. 血小板の血流中の濃度分布の偏り

血流中での血小板の微視的な振る舞いに関しては、in vivo^{1,2)}及び in vitro³⁻⁸⁾ 実験による観察が行われおり、血小板或いは血小板と同じ大きさのラテックス粒子の濃度分布が、壁の近くに偏るといふ (Near-Wall Excess, NWE) 傾向が確認されている。

Tangelderら¹⁾は、ウサギ腸間膜内細動脈 (径21~35 μm) にacridine redを輸注して血小板を蛍光標識し、血管内の血小板分布を蛍光顕微鏡により測定した。そして、厚さ5~7 mmの血管軸を含む薄い層を6つの領域において、高感度カメラの画像上で血小板の分布を調べた。その結果、壁近傍の濃度分布は、管軸付近の分布の約2倍を示すという結果を得ている。この現象は血小板と壁面および血小板同士の相互作用が促進されるた

* 慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻 〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1 Keio University Graduate School of Science and Technology, Major of Fundamental Science and Technology, The Center for Life Science and Technology, 3-14-1 Hiyoshi, Kouhoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 223-8522, Japan. ** 慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科 〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1 Keio University Dept. of System Design Engineering, 3-14-1 Hiyoshi, Kouhoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 223-8522, Japan.

論文受付 2004年8月9日 受理日 2004年8月20日

め、特に血小板の粘着及び凝集機能が効率良く働くために重要な特徴である。

Woldhuisら²⁾は、同様の手法を用いてウサギ腸間膜内の細動脈および細静脈(15-33 μm)における血小板濃度分布をさらに詳細に測定し、両者を比較した。測定領域を管径方向に沿って20に分割し、平均濃度で規格化した血小板濃度分布を調べたところ、管軸近傍では細静脈が細動脈の約2倍の分布を示していたのに対し、壁面近傍では細動脈の方が高濃度であることがわかった。彼らはこの結果に対して、せん断速度の違いによるものではなく、血小板の配向性あるいはヘマトクリットの違い、内皮細胞の特性の違いに起因するだろうとしている。また、白血球の壁上のローリングをデキストラン硫酸塩で抑制し、血小板の濃度分布が壁面の白血球に影響を受けないことを確認している。

このようなin vivoでの観測では、血管を取り巻く環境が複雑で影響要因の識別が困難であるため、条件設定を明確に出来るin vitro実験による観測も行われた。Tiles and Eckstein(1987)³⁾は、ヒト洗浄赤血球と蛍光ラテックス粒子を用いて、ガラス管内の粒子の濃度分布を測定し、粒子濃度の壁付近への偏りの様子を調べた。彼らの実験では、血小板の反応性を除外して考えるため、ラテックス粒子を用いた。Fig. 1は赤血球のHctを変えて測定を行った結果である。Hct=0では、粒子の濃度分布の偏りは生じないところが、Hct=15%以上で、偏りが現れており、

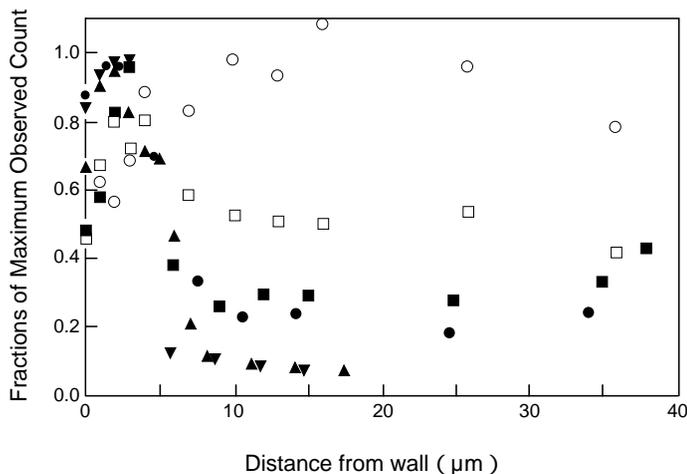


Fig. 1. ラテックス粒子濃度分布が共存する赤血球濃度Hctと深く関係している³⁾。(○: Hct=0, ●: Hct=7%, □: Hct=10%, ■: Hct=15%, △: Hct=30%, ▲: Hct=45%) 赤血球が無い場合(Hct=0)では、濃度分布の偏りが見られないが、Hct=15%以上で、管壁側に濃度分布が偏っている。

赤血球の存在が粒子の濃度分布の偏りに重要な役割を演じていることが分かる。次にFig. 2はせん断依存性を示す結果である。粒子の分布の偏りはせん断速度が430 sec^{-1} 以上で生じている。大変興味深い点は、分布の偏りが生ずるせん断速度では、赤血球が剛体的な振る舞いから変形する液体の振る舞いに移行する部分に相当する。段階的な半径方向の移動は、衝突の結果であ

る。さらに粒子の大きさも重要な要因である。Fig. 3は、粒子の大きさが濃度分布に与える影響を示す⁴⁾。ここで注目すべきは、1 μm 以下では分布の偏りは生じていない。粒子の大きさが2.2 - 5.2 μm の範囲で明確な偏りが生じている。赤血球との

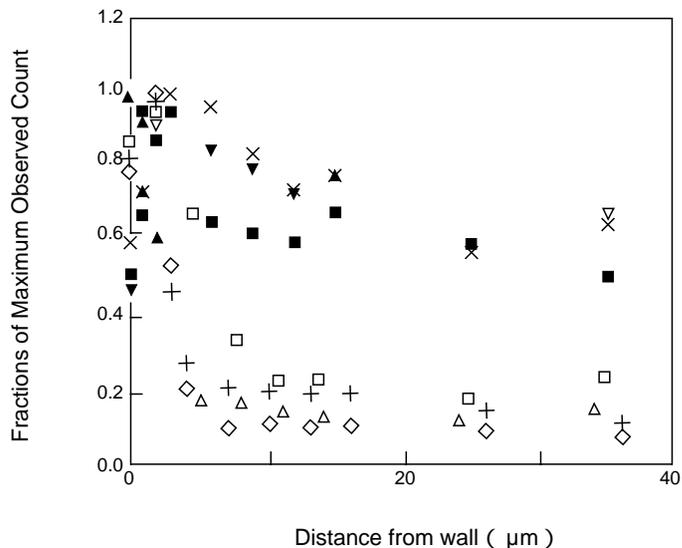


Fig. 2. ラテックス粒子濃度分布のせん断速度依存性³⁾。(○: 50 sec^{-1} , ●: 115 sec^{-1} , x: 210 sec^{-1} , +: 430 sec^{-1} , □: 780 sec^{-1} , ■: 1630 sec^{-1} , △: 3180 sec^{-1}) 粒子の管壁付近への偏りは、430 sec^{-1} 、以上で生じている。

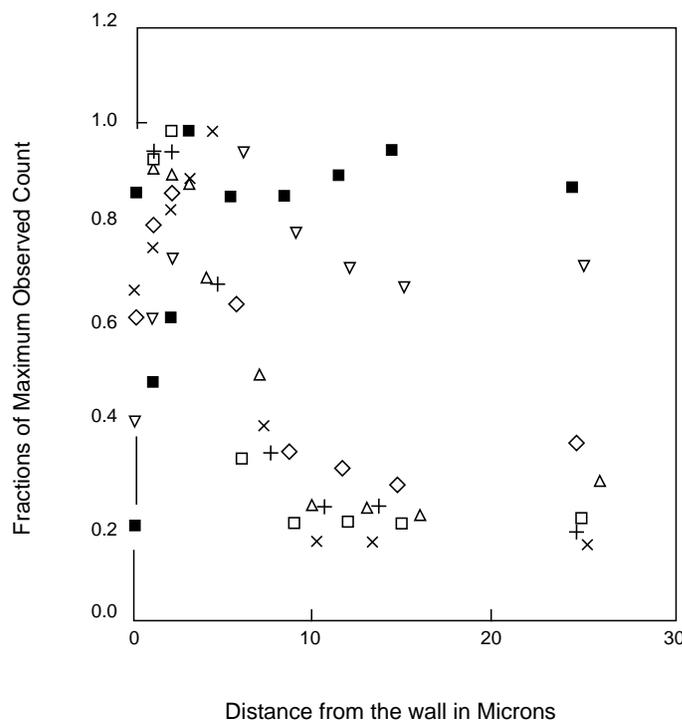


Fig. 3. ラテックス粒子濃度分布に対する粒子大きさの影響³⁾。壁面せん断応力は、1630 sec^{-1} で、Hct=15%における測定結果。(○: 0.96 μm , ●: 1.0 μm , x: 2.2 μm , +: 2.38 μm , □: 3.0 μm , ■: 4.2 μm , △: 5.2 μm .)

関わりが中心ではあるが、ちょうど血小板の大きさで偏りが生じているという結果は、血管内での止血機能を果たすために適切な大きさとして存在しているということになる。

Aartsら⁵⁾は、血小板と赤血球ゴースト(ヘモグロビンを除去したもの)を懸濁したHepes緩衝溶液を内径3 mmのガラス管に灌流した。そして、Laser-Doppler法を用いて赤血球ゴースト及び血小板の管径方向分布を測定した。その結果、血小板は壁面近傍に集中して分布した。ヘマトクリット値を大きくすると、赤血球ゴーストの軸集中は進み、それに伴い血小板の壁面への濃度分布集中の傾向が強くなった。また、せん断速度を上昇させた場合も、ヘマトクリット値を大きくさせた時と同じように血小板の壁面近傍の濃度上昇が観察された。しかし、Aartsらは、ヘマトクリットやせん断速度が高まったことによる、血小板の壁面への粘着の増加は、壁面における血小板の濃度上昇による拡散だけでは十分説明できず、流れ場にある赤血球の回転運動によって更に、その拡散が助長されていると考えた。

Yehら⁶⁾は、血小板のモデルとして径2.5 μm の蛍光性ラテックス粒子を混入させた赤血球懸濁液 (beadsの濃度は $1.5 \sim 2.2 \times 10^6/\text{mm}^3$) を、径220 μm 程度のポリエチレン管に灌流させ、さまざまなヘマトクリット、せん断応力に対する粒子の濃度分布を調べた。測定方法は、まず液体窒素で円管を懸濁液ごと凍らせ、マイクロームで切り出した測定部位を蛍光顕微鏡で観察し、さらにその視野を画像に取り込んだ。粒子像の重心と壁の最短距離を集計し、粒子の分布を測定した。ヘマトクリットの上昇に伴い、分布のピークが壁に寄る傾向は強くなった。また、せん断速度に関しても、せん断速度の違いにより濃度分布ピークの変化が異なるものの、せん断速度が大きくなれば、必ずしも濃度分布のピークが壁によるというような関係は見られなかった。これらの他にも同様な傾向がin vitro実験によって示されている^{7,9)}。

これらのin vivo, in vitro 実験による結果では、血小板或いは血小板を模擬した微粒子の運動は、赤血球との相互作用によって管壁付近に偏りが生ずるというもので、血小板単独にはそのような偏りは生じない。管壁付近への偏りが血小板の粘着や凝集を容易に導入するものであるという合目的性があるとすれば、血小板の止血機構は赤血球との相互作用が本質的であることになり、赤血球のレオロジーを考慮する必要が出てくる。

3. 血液のレオロジーと赤血球の微視的運動

そこで、まず血液のレオロジー的性質について概観してみる。血液の流動は、赤血球や蛋白質の影響を受け、極めて特異な特徴を有している^{10,11)}。回転粘度計により測定された血液の見かけの粘性係数は、せん断速度が大きい時ほぼ一定であるが、せん断速度が小さくなると急激に増加し、血液は非ニュートン流体であることがわかる (Fig. 4.)²⁾。血液の非ニュートン性の主な原因は、赤血球の存在にあると考えられ、特にヘマトクリット値が約13%以上では著しいせん断速度依存性を示す。低いせん断速度では、赤血球は凝集して連鎖 (Rouleaux) を形成す

る¹³⁾。しかし赤血球を血漿蛋白の一つであるアルブミンを加えた生理的食塩水に浮遊させたサスペンション溶液では、低いせん断速度で凝集が起きず、粘性係数が全血の場合よりも低い⁽¹²⁾。一方高いせん断速度では、赤血球は回転楕円体に近く変形し、流れの方向に配向するに伴い、血球膜がせん断応力によって血球内物質のまわりを回転する事実 (tank tread motion) が微視的観察によって見だされている¹⁴⁾。とくに赤血球がせん断力によって変形する性質 (変形能) は、血液のレオロジーにおいて重要な因子であり、その生理学的及び臨床医学的意義のために注目されている。赤血球を化学的処理によって硬化させてしまうと、低いせん断速度で凝集が起きず、高いせん断速度で変形もしない。従って粘性係数はせん断速度に関係なく一定となりニュートン流体的な振舞いを示す (Fig. 4.)。

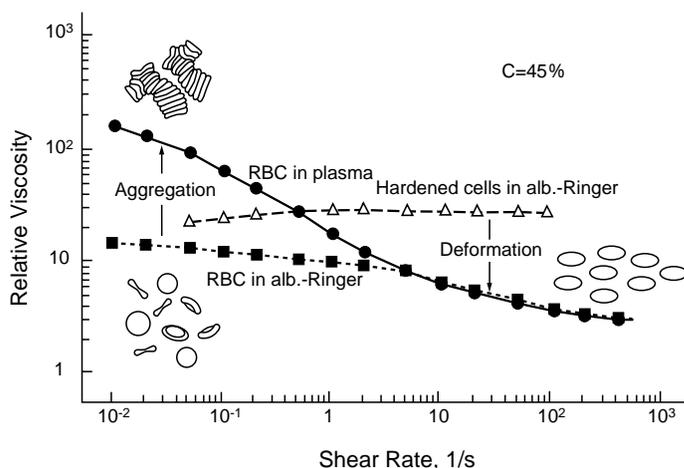


Fig. 4. 全血の相対粘度 (水の粘度との比) のせん断速度依存性¹²⁾。低せん断速度では、赤血球が凝集してルーローを形成し、相対粘度が高くなる。高せん断速度では、赤血球の変形性のために、相対粘度が低くなる。このように粘度がせん断速度によって変化する性質を非ニュートン性と呼ばれる。

せん断力による粒子の変形は、以前からサスペンションのレオロジーにおいて注目されており、G.I. Taylorによる単一粒子の変形の解析¹⁵⁾以来、多くの研究が行なわれている¹⁶⁾。粒子の変形性はそもそも非ニュートン性が生ずる原因となり、非ニュートン性を示す指標の第一および第二法線応力差が、単純すり流動においてゼロにならないことが示されている¹⁷⁾。赤血球の濃度が増加すると見かけの粘性係数が上昇する事実が、剛体球粒子 (Einstein の公式で知られる¹⁸⁾) などの従来のサスペンションの場合と全く同様である。ただし、剛体球粒子の場合は、粒子の濃度が増加するにつれて見かけの粘性係数が変形する粒子の場合よりも急激に増加する (Fig. 5.)¹⁹⁾。

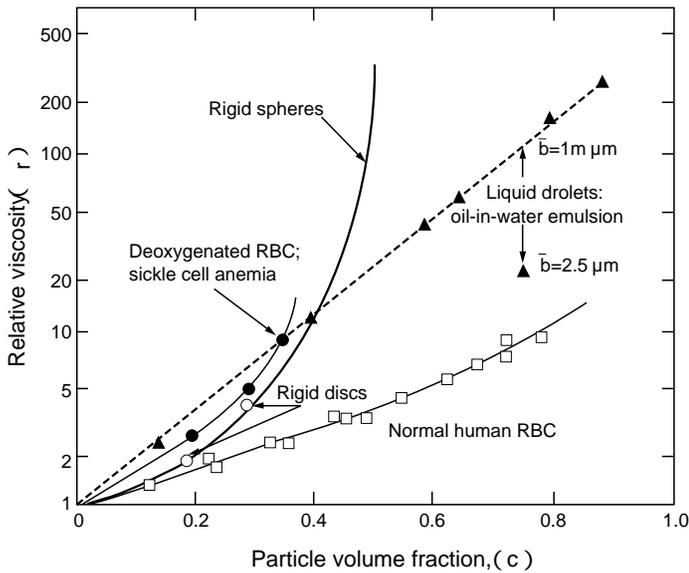


Fig. 5. 全血，硬化赤血球懸濁液，剛体球懸濁液などの相対粘度¹⁹⁾。

4. 粒子の微視的運動

4.1 遅い流れにおける単一粒子の振る舞い

例えば，ニュートン流体の流れの中に単一の球粒子の運動を考える．慣性力の影響の少ない遅い流れにおける球粒子はFig. 6. に示される¹⁰⁾．管内の速度分布は，放物線状であるとする，半径方向にはせん断速度が変化し，壁上で最大となる．せん断は，流体の回転を誘起するので，流れの中に置かれた球粒子も回転する．同時に球粒子は，流れから図に示されるような粘性による圧縮と引っ張りの法線応力を受ける．剛体的な球粒子の場合は，半径方向の移動は生じない．

ところが，変形する粒子では状況が異なる．粒子の周りの圧縮と引っ張りの法線応力によって，球から次第に楕円体に変形し，同時にせん断のために，回転し始め，半径方向に移動 (radial migration) を始める．ここで半径方向の移動には，粒子の変形性とせん断の存在が必要である事に注目したい．

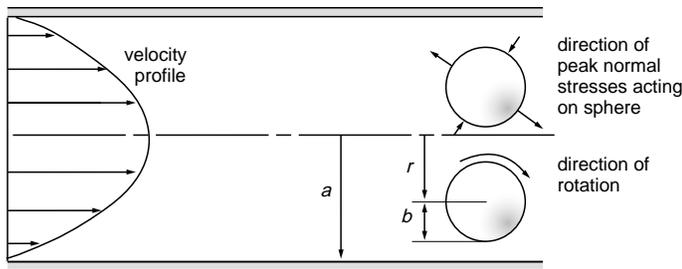


Fig. 6. 管内流れにおかれた球粒子に働く力と回転¹⁰⁾

4.2 早い流れにおける単一粒子の振る舞い

慣性力が顕著になるレイノルズ数では，粒子の振る舞いには

変化が生ずる．変形する粒子は遅い流れと同様に半径方向を移動するが，剛体粒子も半径方向の移動を始める．剛体粒子の半径方向の移動は，tubular pinch効果，又はSegre-Silberberg効果として知られている．剛体粒子の移動は単に管中心に向かうのではなく，管軸付近の粒子は反対に壁側に移動し，管軸と管壁との間のある平衡位置に粒子が集まる．その平衡位置は軸から管半径の60%の場所である．

これらの遅い流れと早い流れの場合の粒子の半径方向の移動の様子をまとめるとFig. 7. のようになる²⁰⁾．粒子の変形性と慣性力の影響が粒子の半径方向の移動に関っている．

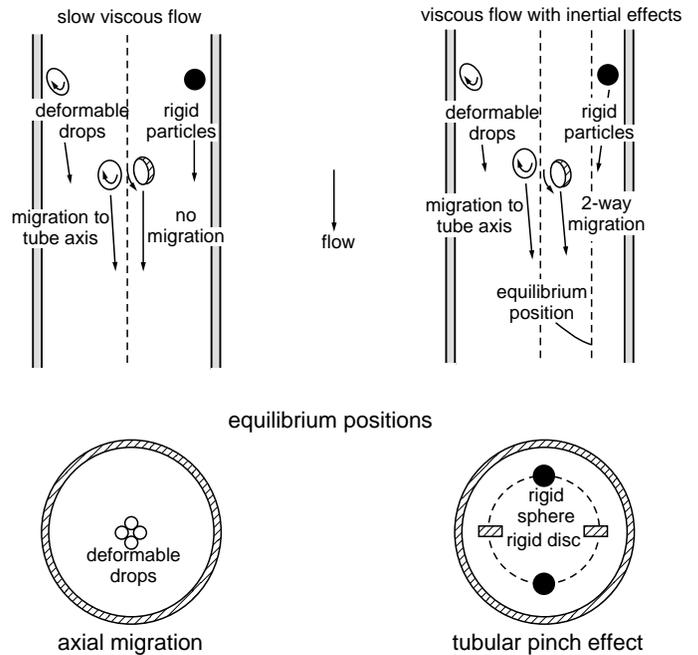


Fig. 7. 遅い流れと早い流れにおける粒子の半径方向の移動の概念図²⁰⁾。

4.3 管内流における単一赤血球の振る舞い

単一赤血球は，剛体粒子的な振る舞いと変形する粒子の振る舞いの両方の側面を示す．遅い流れ即ち低いせん断速度 (20 sec⁻¹ 以下) における赤血球は，剛体平板のように回転し，両凹型の形態を保っている．剛体平板のような赤血球は，管軸方向に向いている場合は，回転角速度が低く，管軸と直角の方向に場合には最大の回転角速度で回転する²⁰⁾．

ところがせん断速度が20 sec⁻¹ 以上になってくると，赤血球は剛体平板のような振る舞いから次第に変化してくる．赤血球は管軸方向に向いている時間が長くなり，せん断速度は100 sec⁻¹では，ほとんどの赤血球が両凹型の形態を余り変えずに管軸方向に向いているようになる．さらにせん断速度が増加するに従い，赤血球の半径方向に移動が現れ，半径方向の移動速度も次第に増加する．

このように赤血球がせん断速度の増加とともに管軸方向に向

いてくる様子をFig. 8. に示す²⁰⁾. 同図では, 赤血球が管軸と20度以内に配向する割合が示されているが, せん断速度が 100 sec^{-1} 以上になるとその割合が60%を超えるようになる. 所が赤血球を硬くするとこの傾向は消失する.

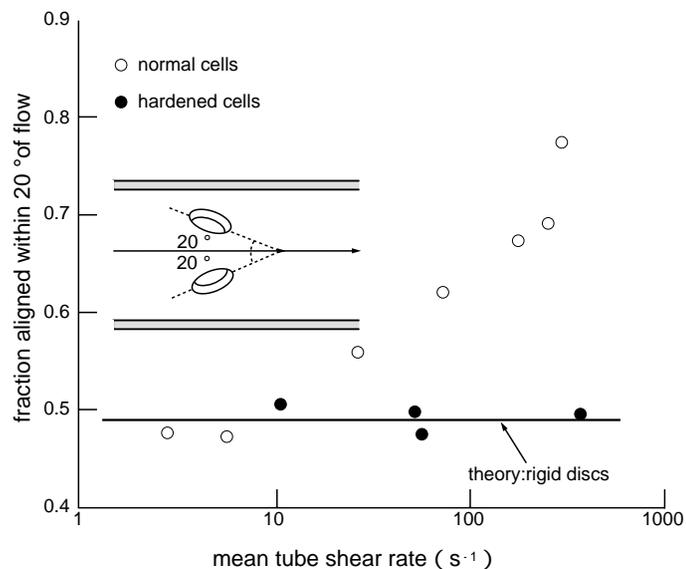


Fig. 8. 赤血球が管軸と20度以内に配向する割合. 硬化させた赤血球では殆ど配向しない²⁰⁾.

5. 濃厚な微粒子懸濁液の流れ

粒子の濃度が0.5%以上になってくると, 粒子同士の相互作用が次第に顕著になってくるので, 単一粒子の振る舞いとは異なってくる. 特に赤血球は単一の場合と異なり, その変形の割合が著しい. 濃厚な懸濁液の流れの様子は, 粒子濃度と粒子の相対的な大きさ (b/a , b : 粒子の大きさ, a : 半径) が重要なパラメータとなる. 粒子が比較的小さい剛体球の場合で, 濃度が5%以下の場合には, 放物型の速度分布になるが, 粒子の相対的な大きさや濃度が大きくなると速度分布は次第に平坦になってくる (Fig. 9.)²¹⁾. しかし, 変形する粒子や液滴の場合は, 速度分布の平坦さが低下し, 放物型により近づく.

一方, 個々の粒子の存在の影響は管半径が小さくなると顕著になってくる. 例えば, 管内径が0.5mm以下になると, 次第に赤血球一個一個の存在による影響が浮き上がり, 血液が一様な流体と見る事が困難となる. とくに, 比較的流量が大きく, 管内径が約 $200 \mu\text{m}$ 以下になると, 血液の見かけの粘性係数が管内径の減少に伴って低下する²²⁾. ところが管内径が $4 \sim 6 \mu\text{m}$ 以下になると赤血球が単に押しつぶされることになり, 逆に粘性係数が増加する (Fig. 10.). この現象は, フォーレウス・リンドクヴィスト効果として広く知られている. 赤血球が管壁の近くから管軸の方向に移動し, 管壁の近くには血漿のみの層 (plasma layer) が生ずるために, このような効果が現われると考えられる. この血漿のみの層の存在が血小板の分布の偏り (NWE) と深く関係しており, 赤血球が管壁から離れると, 同時

に血小板を管壁に押しやるような効果が生じている (margination). 血小板を管壁側に押しやるような現象が, 血小板粘着を生じるために重要な役割を果たしているが, その詳細に関しては不明な点が多い. 従って, 赤血球と血小板との相互作用に関してはさらなる研究が必要と思われる.

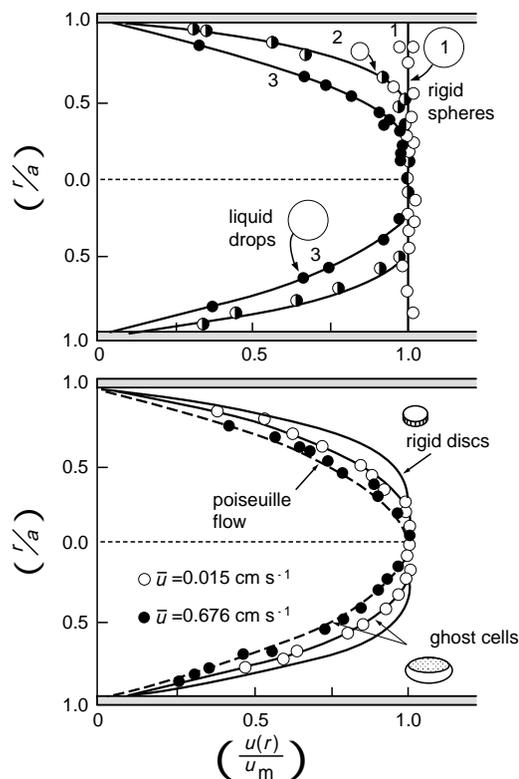


Fig. 9. 濃厚な微粒子懸濁液の速度分布²¹⁾.

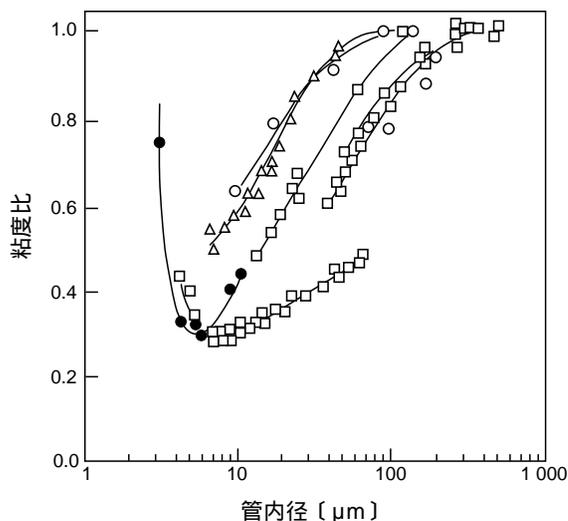


Fig. 10. 細管内の血液の見かけの粘度と太い管内における粘度との比が, 細管の内径の減少とともに低下している. ところが $10 \mu\text{m}$ 以下になると逆に増加し始める.

6. 粒子の半径方向拡散

血小板が赤血球サスペンションの中で、継続的に衝突を繰り返しながら、半径方向に移動している様子は、粒子の濃度分布の偏りを解釈する上で極めて重要な情報である。Goldsmith and Turitto²³⁾は、赤血球ゴーストを用いて、2μmの大きさのラテックス粒子と血小板の軌跡を観測した (Fig. 11.)。粒子や血小板の移動は、半径の位置で0.5Rと0.8Rの領域で移動量が最

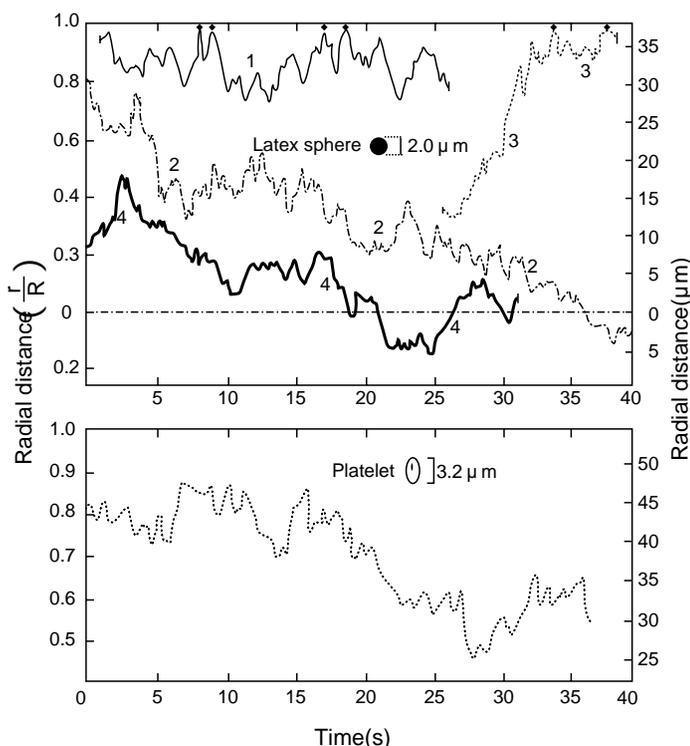


Fig. 11. 血流中の血小板とラテックス粒子の微視的運動の軌跡²³⁾.

大となっている。さらに、粒子の移動の割合をブラウン運動による拡散現象からのアナロジーで以下のような半径方向拡散係数 (dispersion coefficient) を定義した。

$$D_r = \overline{\Delta r^2} / (2\Delta t)$$

ここで、 $\overline{\Delta r^2}$ は、 t の時間における粒子の移動距離の二乗平均である。半径方向における変動を伴う移動は、その場所の局所速度勾配 (せん断速度)、粒子の濃度と変形性などに依存して、粒子同士の衝突の繰り返しによるものと解釈できる。Goldsmith and Tritto²³⁾は実験的に粒子の移動の様子を観測して、拡散係数を求めた。その拡散係数の値を Table 1. に示す。

Table 1. 分子、細胞の拡散係数²³⁾

分子又は細胞	分子量	分子又は細胞の半径	
		nm	m ² /s
水	18	0.15	1.26×10^{-9}
酸素	32		2.75×10^{-9}
塩	58.5	0.23	8.22×10^{-10}
グルコース	180	0.37	5.11×10^{-10}
サクロース	342	0.48	3.94×10^{-10}
血清アルブミン	67000	3.6	5.25×10^{-11}
フィブリノーゲン	330000	9.5	2.00×10^{-11}
血小板		1200	1.58×10^{-13}
赤血球		2800	6.75×10^{-14}

8. 血小板粒子の運動のモデル

また、Eckstein and Belgacem²⁴⁾は、血小板の輸送を対流拡散現象と捕らえる従来の概念を拡張し、確率的な挙動を示す drift termを導入した ((1)式)。Jはfluxでその添え字rは管径方向成分を示し、 V_{drift} がdrift termで血小板の管径方向の速度成分を示す。Dは拡散係数、cは血小板濃度 (添え字fdは流れが十分に発達したことを表す) をそれぞれ示す。

また、血小板数の保存則から $J_r=0$ となり ((2)式)のように表すことができる。

$$J_r = -V_{drift} c_{fd} - D \frac{dc_{fd}}{dr} \quad (1)$$

$$-\frac{V_{drift}}{D} = \frac{1}{c_{fd}} \frac{dc_{fd}}{dr} = \frac{d(\ln c_{fd})}{dr} \quad (2)$$

このようなモデルを用いてEcksteinらは極めて興味深いシミュレーションを行っている。Fig. 12. は、そのシミュレーション結果で、血管壁への粒子の粘着と粒子の変動がどのような影響を与えるかを調べた。まずAは、全ての粒子の不可逆的な粘着と半径方向の変動を考慮にいたった結果である。それぞれの曲線は上から管の入り口から流入し、管の軸方向位置での分布を示している。Bの結果は、半径方向の変動を考慮しない分布で、粒子の濃度分布の偏りが見られていない。Cの結果は、半径方向の変動はAと同じであるが、壁への粒子の粘着はAほど強固でなく、Aの半分程度の粘着の壁としている。これらのA,B,Cの場合の壁に粘着した粒子の数を軸方向でプロットしたものがDである。Dの図で明らかのように、半径方向の変動が無い (即ち拡散がない) 場合は、粘着する粒子が最も少ない。ところが、半径方向に変動があり、且つ強固な粘着をする壁Aでは、粘着する粒子が最も多い。特に管の入り口付近ではその差が大

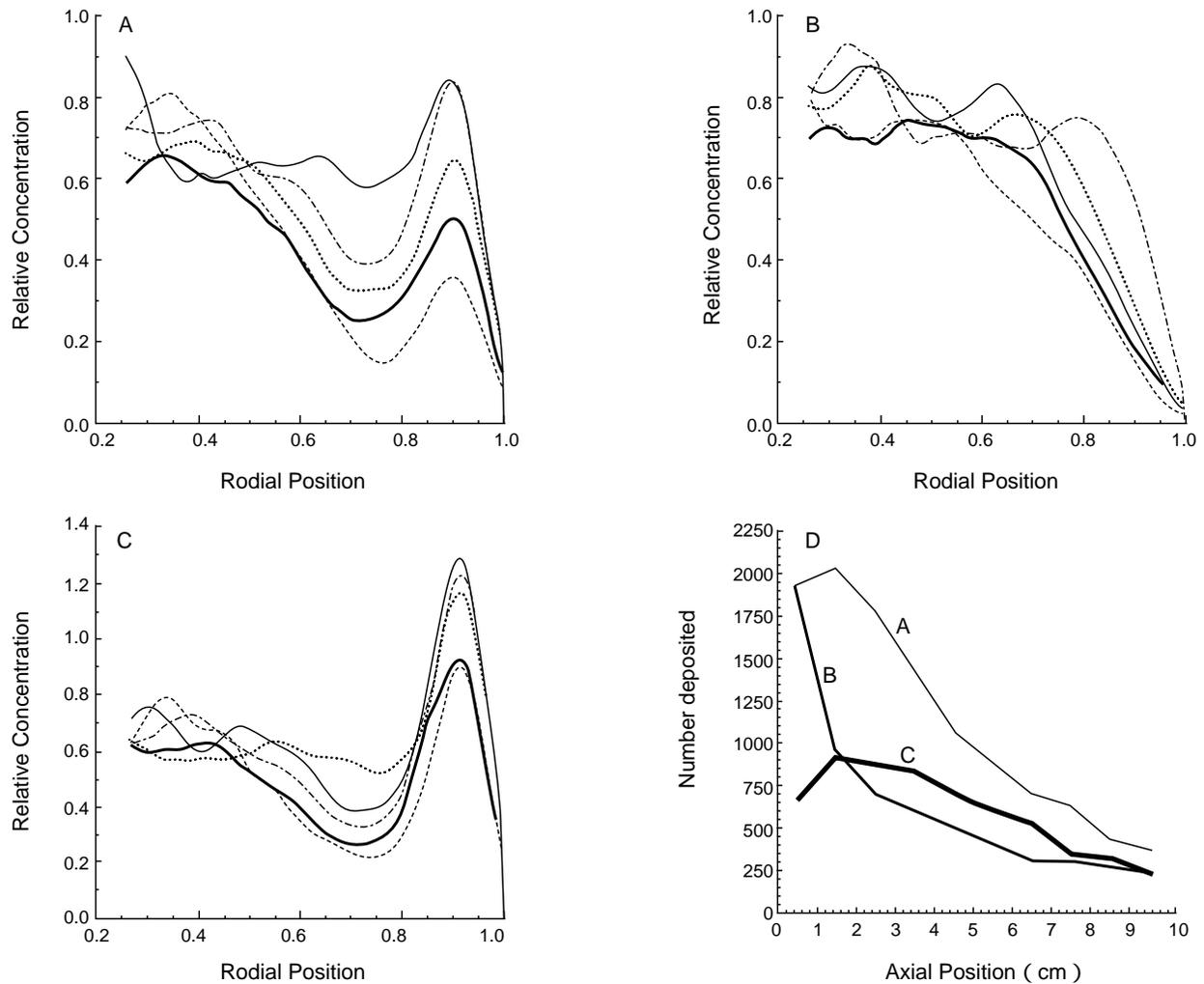


Fig. 12. 血小板移動モデルによるシミュレーション結果⁹⁾.

きい。このシミュレーション結果は、血小板の血流中の運動と管壁への粘着との関わりを示しているという点で、極めて重要な意義を持っている。

9. おわりに

既に、幾つかの人工血小板のプロトタイプが開発され、その管壁における粘着のせん断依存性などの様子が明らかになっている²⁵⁻²⁷⁾。従って、血小板粒子が管壁に無事着陸して粘着するプロセスが繰り返されることで、壁面での凝集塊が成長し、止血効果が現れるためには、血流から如何に粒子を管壁面に送り込むかが重要なプロセスとなる。血小板粒子が赤血球が存在している血流中では、極めて特異な微視的な運動を展開しており、その特異な微視的運動により粒子が壁面に送り込まれ、壁への粘着現象を促進していることも解釈できる。従って、人工血小板が生体の血管内で血小板機能を代替するためには、単に人工血小板表面の糖タンパクの粘着性のみならず、血流中での赤血球との相互作用の結果生じる濃度分布の偏りと半径方向の拡散を如何に維持するかが極めて重要な課題となり、実験的なアプローチに

より微視的運動の解明が進んでいる^{28,29)}。

文献

1. Tangelder GJ, Slaaf DW, Teirlinck HC, Alewijnse R, Reneman RS. Localization within a thin optical section of fluorescent blood platelets flowing in a microvessel. *Microvasc Res* 1982; 23:214-230.
2. Woldhuis B, Tangelder GJ, Slaaf DW and Reneman RS. Concentration profile of blood platelets differs in arterioles and venules, *Am J Physiol* 1992; 262 : (4 pt 2), H1217-1223
3. Tilles AW, Eckstein EC. The near-wall excess of platelet-sized particles in blood flow: Its dependence on hematocrit and wall shear rate. *Microvasc Res* 1987; 33:211-223.
4. Eckstein EC, Tilles AW, Millero FJ. Conditions for the occurrence of large near-wall excesses of small particles during blood flow. *Microvasc Res* 1988; 36:31-39.
5. Apartis PAMM, van den Broek SAT, Prins GW, Kuiken

- GDC, Sixma JJ, Heethaar RM. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 819-824.
6. Yeh C and Eugene C Eckstein. Transient Lateral Transport of Platelet-Sized Particles in Flowing Blood Suspensions. *Biophys J* 1994; 66 : 1706-1716.
 7. Bilsker D L, Waters C M, Kippenhan J S, Eckstein E C. A freeze-capture method for the study of platelet-sized particle distribution. *Biorheology* 1989; 26:1031-1040.
 8. Waters C M, Eckstein E C. Concentration profiles of platelet-sized latex beads for conditions relevant to hollow-fiber hemodialyzers, *Artif Organs* 1990; 14:7-13.
 9. Eckstein E C, Koleski J F, Waters C M. Concentration profiles of 1 and 2.5 mm beads during blood flow:hematocrit effects. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1989; 35:188-190.
 10. Caro CG, et al., *The Mechanics of the Circulation* 1978, Oxford Univ.Press.
 11. 岡小天, バイオレオロジー, 1984, 掌華房
 12. Chien S *Science* 1970; 168: 977
 13. Goldsmith HL & Mason SG. *Rheology* 1967; 4:85, Academic Press.
 14. Fischer TM., Stohr-Liser & Schmidt-Schonbein, *Science* 1978; 202:894
 15. Taylor GI. *Proc. Roy. Soc* 1934; A146: 501
 16. Brenner H. *Suspension Rheology, Progressive Heat & Mass Transfer (W.R.Schowalter Ed.)* 1972; 5: 89
 17. Schowalter WR. *Mechanics of Non-Newtonian Fluids* 1978; 264 Pergamon Press.
 18. Einstei A. *Ann.Physik* 1906; 19: 289
 19. Goldsmith HL, Mason SG. The microrheology of dispersions. In: *Rheology, Theory and Applications*. Eirich, FR (ed.) Academic Press, New York, 1967; Vol. IV: 87-205
 20. Goldsmith HL. Red cell motions and wall interactions in the tube flow, *Fedn Proc. Fedn. Am Socsexp Biol* 1971; 30: 1578-1588.
 21. Goldsmith HL. The flow of model particles and blood cells and its relation to thrombogenesis. Spaet TH, ed. *In Progress in Hemostasis and Thrombosis*. New York : Grune & Stratton, 1971; 1: 97-139
 22. Gaehtgens P. *Biorheology* 1980; 17: 183
 23. Goldsmith HL and Tritto VT. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications, *Thrombosis and Haemostasis* 1986; 55:415-435
 24. Eckstein EC and Belgacem F. Model of platelet transport in flowing blood with drift and diffusion terms, *Biophys J*, 1991; 60: 53-69.
 25. Ikeda Y, Murata M, Goto S. Von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation: basic mechanisms and clinical implications, *Annals New York Academy of Sciences* 1977; 811:325-26
 26. Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Targeting of Liposomes carrying recombinant fragments of Platelet membrane glycoprotein Iba to immobilized von Willebrand factor under flow conditions, *BBRC* 2000; 270: 755-760.
 27. Takeoka S, Teremura Y, Ohkawa H, Ikeda Y, Tsuchida E. conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib to size-controlled albumin microspheres *Biomacromolecules* 2000; 1: 290-295.
 28. Fujita H, Tsuji T, Tabata T, Takeoka S, Ikeda Y, Tanishita, K. Motion of artificial platelet in the model arteriole, *Proc. Summer Bioengineering Conference 2003 (CD-ROM)*
 29. Tanishita K, Fujita K, Tsuji T, Tabata T, Takeoka S and Ikeda Y. Observation of microscopic motion of artificial platelets in the model arteriole, *Proc. IX Int. Symp on Blood Substitues* 2003.

編集後記

本号では、高折先生より臨床治験に向けた酸素運搬体の要件に関する論説を掲載しています。酸素運搬体の開発における要件が分り易く述べられており、開発者必読です。10巻2号「liposome-encapsulated hemoglobinの有効性，安全性への検討」、10巻4号「人工血液（HbV）安全性，有効性に関する治験計画」に続く3つ目ですので、これらの論説も併せてご覧ください。

さい。（当学会のホームページからダウンロード可能です。http://www.blood-sub.jp/journal/back_number.html）。また、巨核球からの血小板の誘導や血小板の血流中の動態に関する読み応えのある総説も掲載できました。次号より順次第11回年次大会で発表された論文を掲載する予定です。

（武岡 真司）

投稿規定

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

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4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよび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(、)とピリオド(。)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こと。
 - 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, 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. リボソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リボソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
 3. Fowler SA, Andracki 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、あらかじめ著作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。

[本誌掲載著作物の二次利用および著作権について]
以下の点につきまして、あらかじめご了承ください。

本誌の一部、もしくは全部をCD-ROM, インターネットなどのニューメディアに二次利用させていただく場合があります。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)は本学会に譲渡されたものとします。したがって、上記の諸権利の承諾は本学会で行います(本項については、著作者ご自身の再利用を拘束するものではありませんが、再利用される場合はご一報ください)。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。

編集委員会

武岡真司(委員長), 東 寛, 池淵研二, 酒井宏水, 津田良夫, 福島昭二, 堀之内宏之, 宮尾秀樹, 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.12(3) 2004年11月20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

早稲田大学理工学部65-208室

TEL(03)5286-3217 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