

人工血液

第 14 卷 第 2 号 2006 年 9 月

目次

総説	「人工酸素運搬体の製造に関する基本的留意事項 - 薬事の視点から」	小澤健夫	34
	FDAにおける人工酸素運搬体の研究開発に関する ガイダンスの要点	川上浩司	40
	ポリ(エチレングリコール)修飾アルブミン-ヘム： 酸素輸送血漿増量剤としての溶液物性と機能	小松晃之	47
	血管炎治療のための人工ガンマグロブリンの開発に関する研究	鈴木和男	55
トピックス	ヘモグロビン小胞体を用いた人工心肺充填液による高次脳機能保護効果 - ラット人工心肺モデルによる検討 -	山崎真敬	62

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 14 No. 2 September, 2006

Contents

<i>Review: Regulatory Aspect on "Fundamental View Point on Oxygen Carrier Products and their Manufacturing"</i>	<i>Takeo Ozawa</i>	34
<i>Regulatory Aspects for the Oxygen Therapeutics in the United States</i>	<i>Koji Kawakami</i>	40
<i>Poly (ethylene glycol) -Conjugated Albumin-Heme: Solution Properties and Functions as O₂-Carrying Plasma Expander</i>	<i>Teruyuki Komatsu</i>	47
<i>Immunomodulatory Therapy for Vasculitis with a Synthetic IVIg</i>	<i>Kazuo Suzuki</i>	55
<i>Topics: Use of Hemoglobin Vesicles during Cardiopulmonary Bypass Priming Prevents Neurocognitive Decline in Rats</i>	<i>Masataka Yamazaki</i>	62

「人工酸素運搬体の製造に関する基本的留意事項 - 薬事の視点から」

Regulatory Aspect on "Fundamental View Point on Oxygen Carrier Products and their Manufacturing"

小澤健夫

Takeo Ozawa

和文抄録

わが国で開発されたリポソーム小胞体内にヒトヘモグロビンを包埋した人工酸素運搬体（リポソーム型Hb）の臨床応用の時期が目前となっている。一方で人工酸素運搬体開発の歴史は古く、微小酸素泡沫による還流の試みから始まり、パーフルオロカーボン（PFC）および修飾Hbの開発へ移行し、様々な問題に直面してきた。現在、米国において数種の修飾ヘモグロビン（修飾Hb）の開発が最終段階にあるが、有効性・安全性が十分に検証され商品化された人工酸素運搬体は未だ存在しない。

これら米国において開発の最終段階にある修飾Hbを支えるべく、米国規制当局側の審査母体である食品医薬品局（FDA）・生物製剤評価センター（CBER）は“Guidance for Industry: Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitute”のガイダンス案を2004年10月に発行した。

わが国でも2005年の日本血液代替物学会年次大会において「人工酸素運搬体の製造に関する基本的留意事項」として、より安全なリポソーム型Hbの臨床応用の参考となるべく方向性が示された。本稿では、本基本的留意事項を薬事的な視点から解説する。

Abstract

Clinical application is expected in the near future for an artificial oxygen carrier (liposome encapsulated hemoglobin) developed in Japan which consists of human hemoglobin (Hb) enclosed in liposomal endoplasmic reticula. Development of artificial oxygen carriers has a long history. It started with an attempt to perfuse micro oxygen bubbles and progressed to the development of perfluorocarbon (PFC) and modified Hb. Their development was blocked by various problems. At present, a number of modified Hb products are at the final stage of development in the US, but no artificial oxygen carrier with validated efficacy and safety has been commercialized.

In the US, the Food and Drug Administration's Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) the new drug application review authority, issued proposed "Guidance for Industry: Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitute" in October 2004 in order to support the development of these modified Hb products at the final stage of development.

In Japan, the "Fundamental View Points on Oxygen Carrier Products and their Manufacturing" were adopted as a guide for clinical application of safer liposome encapsulated hemoglobin products at the annual assembly of the Society of Blood Substitutes, Japan in 2005. This paper explains these "fundamental view point" from the regulatory viewpoints.

Keywords

artificial oxygen carrier, liposome encapsulated hemoglobin, perfluorocarbon, modified hemoglobin, guidance, regulatory .

はじめに

少子高齢化に伴う将来的な献血人口の減少および輸血対象人口の増加、災害時や緊急事態のための赤血球製剤の備蓄、さらには輸血感染症の出現などの問題の深刻化に備え、わが国では2003年1月24日付の「安全な血液製剤の安全性確保等に関する法律（血液新法）」の第9条に基づく基本方針の中で、人工血液をはじめ、新たに開発される血液代替医薬品の研究開発の促進が宣言されている。また、血液新法の国会審議における衆議院厚生労働委員会決議では、「政府は、医薬品・医療機器による健康被害を再度発生させることがないよう最善の努力をするとともに、速やかに適切な措置を講ずるべきである」という宣言がなされ、この宣言の中でも人工血液の研究開発の促進が明言されている。すなわち、人工酸素運搬体を含む血液代替物の開発は、わが国を挙げての国策として位置づけられていると言っても過言ではない。

一方、わが国で開発されたリポソーム小胞体内にヒトヘモグロビンを包埋した人工酸素運搬体（リポソーム型Hb）の臨床応用の時期が目前となっている状況において、薬事行政的な観点からリポソーム型Hbの開発用途を考えると、虚血性疾患に対する開発よりも血液代替物としての開発が優先されることが望まれる。なぜならば、現時点では献血血液由来のHbをリポソーム型Hbに使用することが最も現実的であるという側面から、行政側のニーズと合致し、社会的理解が得られやすい適用であるということがその大きな理由である。日本血液代替物学会の策定した「人工酸素運搬体の製造に関する基本的留意事項（以下、基本的留意事項という）」もこの趣旨に合致しており、学会としての方向性も薬事行政とその向きを同じとしている¹⁾。本稿においては、この基本的留意事項の根幹について、薬事的な視点からの意見を述べたい。

1. 血液新法と国策としての人工血液の開発促進

血液製剤の安全性の向上、安定供給の確保および適正使用の推進をめざす「国内の献血血液による血液製剤の国内自給の確保」を基本理念とした「安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律（血液新法）」が2002年7月に制定され、2003年7月より施行された。血液新法制定の背景には、血液製剤によるB型肝炎・C型肝炎・AIDS発症が大きな社会問題となり、これらの血液製剤による感染症発症の危険性の減少と発症した場合の早期安全性確保対策の必要が強く社会から求められたことにある。これらの問題解決の対応策として、血液新法では血液製剤の国内自給および適正使用を掲げている。また、これらの対応策を実現する具体的な手段としては、献血活動の推進、血液製剤の適正使用指針の策定および人工血液の研究開発促進が挙げられている。

国策として人工血液の研究開発の促進が謳われている背景としては、以下のような行政側からのニーズがあると考えられる。

- 少子高齢化に伴う将来的な献血人口の減少と輸血対象人口の増加

- 災害時・緊急時のための備蓄
- 日本に伝播していないウイルスや未知のウイルスによる献血血液汚染

これらの行政側からのニーズを支えるべく、血液新法制定時の国会審議における衆議院厚生労働委員会決議において、「医薬品・医療機器による健康被害を再度発生させることがないよう最善の努力をするとともに、速やかに適切な措置を講ずるべきである」という答申がなされ、人工血液の研究開発の促進が提言されている。さらに、2003年1月の血液新法第9条に基づく基本方針の中では、人工血液をはじめとする新たに開発される血液代替医薬品の研究開発の促進が提言されている。すなわち、人工血液の研究開発そのものが、血液新法に支えられた国策となっている。

2. 米国における"Guidance for Industry: Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitute (FDA CBER, 2004年10月)"のガイダンス案に学ぶ「人工酸素運搬体の製造に関する基本的留意事項」

本米国ガイダンス案は、修飾HbおよびPFCの酸素運搬体としての使用に言及しているが、実質的には、現在、開発の最終段階にある数種の修飾Hbの開発を支えていると言ってよい（リポソーム型Hbは対象外）。過去に、米国で最も期待されていた修飾Hbは、Hbのサブユニット間をジアスピリンで架橋し、4量体を維持した製剤であった。この製剤の開発は米国海軍医学研究所から製薬企業に引き継がれ、1990年代後半に出血性ショックを対象とした第Ⅲ相臨床試験が行われたが、分子サイズの問題からNOとの相互作用が避けられず、比較対照薬である生理食塩液に生存率で勝ることが出来なかった²⁾。このような歴史を経て、次世代の修飾Hbが登場し、その開発が最終段階にきたことから、社会的な理解を得ながら次世代の修飾Hbの開発を支えることを目的として過去の修飾Hb開発の教訓を加味したガイダンス（案）が策定されたものと考えられる。

本基本的留意事項は、米国で人工酸素運搬体開発の臨床応用が散見されつつある時期に作成された指針“Point to Consider on Safety Evaluation of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers”の概念に相当するものと考えられ、リポソーム型Hbの臨床応用が目前となった時期とその発行時期を同じとする。したがって、薬事行政的観点から見れば、本基本的留意事項の発行時期は妥当であり、今後は米国のガイダンス（案）と同様に、現時点で臨床応用経験のないリポソーム型Hbの開発過程における新しい知見や発見とともに成長することが必要であろう。米国と同様に、現時点から本基本的留意事項の策定過程に規制当局側も参加することが理想と考えるが、今後の発展過程における課題として認識したい。参考までに、米国のガイダンス（案）の成長過程を示す（Table 1.）³⁾。

Table 1. History of Oxygen Carriers recommendations inUS

August, 1990	Point to Consider on Safety Evaluation of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers(3)
September, 1997	Guidance for Industry: Efficacy Evaluation of Hemoglobin- and Perfluorocarbon-Based Oxygen Carriers(DRAFT) Replace for Point of Consider, August, 1990(4)
September, 1999	Public Work Shop entitled "Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitutes" under the joint sponsorship of FDA CBER, the National Heart, Lung, and Blood Institute, the Department of Defense, U.S. Army Medical and Material Command and the Armed Services Blood Program Office(5)
October, 2004	New Draft Guidance for Oxygen Carriers(6) Replace for Draft Guidance, September 1997

3. 薬事の視点から考える「人工酸素運搬体の製造に関する基本的留意事項」

1) 目的, 背景

薬事的な視点から, 本基本的留意事項の「目的と背景」の妥当性について考える. 本基本的留意事項の目的, 背景および適応対象物は, 以下のとおりである.

➤ 目的

本事項は前臨床試験を目的とした人工酸素運搬体の製造のための基本を示したものである.

➤ 背景

現在, 開発が進められている人工酸素運搬体には数種存在するが, わが国においてはヒトヘモグロビン(Hb)をリポソームにて包埋したもの(リポソーム型ヘモグロビン: リポソーム型Hb)を生理食塩液中に浮遊させたタイプのものである. 今後の臨床応用を目的として前臨床試験を行うための製品を開発するにあたり, 十分な社会的理解と同意が得られるように留意する.

➤ 適応対象物

製品開発・製造に関する留意事項はリポソーム型Hbを生理食塩液に浮遊させたものに適用し, 生理食塩液以外の溶液に浮遊させた製品に対しては別途規定を設ける.

現時点では, リポソーム型Hbの開発は基礎研究段階であり, これから本格的な製薬としての研究開発段階へと突入することから, 製薬としての指標となるようなコンセンサスの確立が望まれる. このような段階では, 規制的な側面を強く押し出すより, むしろ医薬品開発の根幹となる3つの規範であるGood Manufacturing Practice (GMP), Good Laboratory Practice (GLP) およびGood Clinical Practice (GCP) を意識した柔軟性のある指標が必要と考える.

上述のような背景を意識し, 本基本的留意事項の目的, 背景および適応対象物について考えると, その目的は「製造のための基本を示したもの」であり, 背景としては「今後の臨床応用を見据えている」ことが述べられており, さらに適応対象物が, 実際に開発が進んでいる「リポソーム型Hbを生理食塩液に浮遊させたもの」を対象としていることから, 現実には即した開発段階に調和したものであることが分かる.

米国のガイダンスをそのまま日本のガイダンスとしてトレースするのではなく, 開発の状況や段階に合わせた基本的留意事項が策定されたことは, 大きく評価できる. 今後は, リポソーム型Hbの開発過程における新しい知見や発見とともに, 本基本的留意事項を成長させることが必要であろう.

2) 人工酸素運搬体の定義

本基本的留意事項における人工酸素運搬体は, 以下のよう
に定義されている.

- 赤血球に代わり循環器系において酸素運搬能をつかさどる人工生産物とする. とくに血液(赤血球)喪失時において組織酸素代謝の改善・維持をその主な目的とする.

米国のガイダンス案において示されている人工酸素運搬体の適用可能な使用用途をTable 2.に示す⁵⁾. 米国では, 局所治療, 待機手術および外傷による大量出血が, 人工酸素運搬体の可能性のある適用として考えられている. 一方, 本基本的留意事項では, 上述のとおり血液代替物としての適用が検討されている. この血液代替物としての適用は, 人工血液の研究開発を促進するという国策の考えに準じており, この国策の考えと同じ方向性が強く示されていることは高く評価できる.

Table 2. Potential Indications for Oxygen Carriers in US

Ptential Indications	Remarks
Local Effects / Regional perfusion	Perfusion during coronary angioplasty(FDA-approved indication for a perfluorocarbon preparation, Fluosol™) Increase the sensitivity of tumors to radiation or to chemotherapy(Systemically administered)
Perioperative indications	Elective surgical indications(allogeneic transfusion or autologus transfusion)
Trauma	-

したがって、社会的ニーズに応じた血液代替物としての人工酸素運搬体の研究開発を最優先することが開発企業に期待されるであろう。さらに、現時点では、製造原料となるヒト由来血液に限りがあることから、まずは血液代替物としての人工酸素運搬体の開発が望まれるであろう。

「細胞・組織利用医薬品等」とは、生物由来医薬品又は生物由来医療用具のうち、ヒト又は動物の細胞・組織から構成されたものをいい、自己の細胞・組織を原材料とする医薬品及び医療用具が含まれる。ただし、血液製剤は含まれない。

3) リポソーム型Hbの開発状況

リポソーム型Hbの研究開発は、未だ基礎研究の段階で、これから製薬としての製造、非臨床試験および臨床試験を迎える状況である。現時点で臨床応用例はなく、ヒトにおける安全性ならびに有効性の検討が今後の大きな課題となる。このような現状において、開発コンセンサスにあまりに高いハードルを課すと研究開発の進展を妨げる可能性もあるため、現時点では臨床応用に向けた指標となるようなコンセンサスが望ましい。

本基本留意事項の名称にガイダンスやガイドラインもというような表現を用いていないことは、策定者らの現状への深い配慮が伺える。

また、本基本的留意事項は、米国で人工酸素運搬体開発のコンセンサスを初めて示した“Point to Consider”に相当するものと考えられ、リポソーム型Hb開発の現状を反映した位置づけは高く評価できる。

➤ ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について（平成12年12月26日医薬発第1314号）

【ヒト又は動物由来医薬品等の対象範囲】

ヒト又は動物由来医薬品等の範囲は以下のとおりとする。ただし、生物学的製剤基準に収載されている血液製剤及び専ら人体に直接使用されないもの(体外診断用医薬品)等を除く。

ヒト血液由来Hbを用いたリポソーム型Hbの原料である「人赤血球濃厚液」は血液製剤として認可されていることから、上述の2つの通知より、薬事法上の「細胞・組織医薬品」には該当しないと考えられる。

次に、薬事法上の「生物由来製剤」への分類を検討する。生物由来製剤は、感染リスクに応じた安全対策推進のため、法的な定義により以下の2類型に分類される。

4) リポソーム型Hbの薬事法上の分類⁷⁾

(1) ヒト血液由来Hbを用いたリポソーム型Hb

ヒト血液由来Hbを用いたリポソーム型Hbがヒト赤血球を製造原料とすることから、まずは薬事法上の「細胞・組織利用医薬品」に分類されるか否かを検討する。「細胞・組織利用医薬品」の定義は、以下のとおり当該通知で述べられている。

➤ 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方

(平成13年3月28日医薬発第266号)

【細胞・組織利用医薬品等の定義】

【生物由来製品】

人その他の生物(除植物)由来であって保健衛生上特別の注意を要するもの

(例) 遺伝子組換え製剤、自己由来製剤、ワクチン等

【特定生物由来製品】

生物由来製剤のうち、市販後に保健衛生上の危害発生・拡大防止のための措置が必要なもの

(例) 人血液製剤、人細胞組織医薬品等

さらに安全確保のための措置として、「生物由来製品」では原材料記録の保管、品質管理基準の上乗せおよび表示の特例等の義務が課せられ、「特定生物由来製品」で

は生物由来製品と同様の安全確保措置に加え、遡及調査のための記録の作成・保存等の義務が課せられる。

ヒト血液由来Hbを用いたリポソーム型Hbの薬事法上の「生物由来製剤」への分類についてであるが、製造原料となる「人赤血球濃厚液（ヒト血液製剤）」が「特定生物由来製品」に分類されることから、これと同様に「特定生物由来製品」に分類される可能性がある。

しかしながら、ヒト血液由来Hbを用いたリポソーム型Hbの製造においては、「人赤血球濃厚液」からHbを抽出・精製する際にウイルス不活化工程があり、この工程の精度次第では「人赤血球濃厚液」とは別物と考える余地がわずかながら残されているかも知れない。ただし、未知のウイルスによる献血血液汚染の危惧に話が及んだ場合は、「特定生物由来製品」として分類されることは必至であろう。本件については、規制当局側と十分なコンセンサスをとりながら、ヒト血液由来Hbを用いたリポソーム型Hbの研究開発を進める必要があると思われる。

(2) リコンビナントHbを用いたリポソーム型Hb

リコンビナントHbを用いたリポソーム型Hbは、ヒト血液由来Hbを用いたリポソーム型Hbに続く第2世代のリポソーム型Hbとして期待される。ヒト血液を製造原料とする場合は原料供給に限りがあるため、常に原料確保についての考慮が必要となるが、リコンビナントHbの場合は、このような製造原料確保に対する心配がなく、献血血液からのウイルス混入の心配も不要となる。

しかし、リコンビナントHbについては、その効率的な培養・精製方法などがまだ初期検討の段階であり、製造コストも非常に高くなることが考えられるため、実用化検討のステージは当分先の話になると思われる。

リコンビナントHbを用いたリポソーム型Hbの薬事法上の分類については、リコンビナントHbが遺伝子組換え技術や細胞培養技術を必要とするバイオテクノロジー応用医薬品であることから、以下の通知から判断して「生物由来製剤」に指定されると思われる。

- 組換えDNA技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について
(昭和59年3月30日薬審第243号)
- 細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について
(昭和63年6月6日薬1審第10号)

しかしながら、血液新法の国会審議における参議院厚生労働委員会の付帯決議の一つに「血液製剤代替遺伝子組換え製剤の必要に応じた特定生物由来製品への指定」が挙げられている。したがって、リコンビナントHbを用いたリポソーム型Hbも「特定生物由来製品」に指定される可能性は否定できない。リコンビナントHbを用いたリ

ポソーム型Hbの研究開発においても、その開発過程から規制当局側との十分なコンセンサスが必要になると考えられる。

4. おわりに

本基本的留意事項に対する感想を以下に述べる。米国のガイダンスの発展と同様に、本基本的留意事項もリポソーム型Hbの開発過程における新しい知見や発見とともに成長・発展させることが必要であろう。

- 人工酸素運搬体の使用可能な用途が多岐にわたる中、本基本的留意事項では「人工酸素運搬体の定義」において最重要課題である血液代替としての用途を明確にしておき、さらにこの用途は行政側のニーズともその方向性が合致している。この考え方は高く評価できる。
- 本基本的留意事項は、現時点の最新知見が反映されていないが、リポソーム型Hbは未だ臨床応用経験がないので、将来的には臨床成績を加味したフレキシブルな内容の見直しが必要になると思われる。
- 本基本的留意事項では、製造面のみでなく、品質や安全性面にも言及している。「品質」という言葉には、広義に「製造」という意味も含まれていると解釈できることから、タイトルを「人工酸素運搬体の品質及び安全性に関する基本的留意事項」としても良いと感じる。
- これまでの基礎研究成果とこれからの臨床応用を加味して、比較的バランスがとれて仕上がっているように感じられる。
- 先進的な医薬品開発において、過度の規制は研究開発の進展を阻害する。リポソーム型Hbは未だ臨床応用経験がないので、米国と同様に開発状況に応じたコンセンサスを作り、状況に応じてコンセンサスを成長・発展させることが早期実用化を実現する早道と考える。したがって、開発初期段階から必要以上のハードルを課さないように、これからも開発状況を加味したコンセンサスの作成を期待したい。
- 人工酸素運搬体の実用化には「企業」の力が必要である。「官」、「学」のみならず「産」からのコメントを求めるステップが必要と感じられる。
- 本基本的留意事項が、将来的に開発されると思われるリコンビナントHbを原料としたリポソーム型Hbのことも想定しているならば若干の物足りなさを感じる。「遺伝子組換え」や「細胞培養」に関する記載が認められないためである。しかし、現時点での開発状況を考慮すると、ヒト血液由来Hbを用いたリポソーム型Hbに特化した本基本的留意事項でも十分であるとも考えられる。
- ヒト血液由来Hbを用いたリポソーム型Hbの開発初期では、期限切れ血液を製造原料とすることが想定される。この場合は、社会的理解が十分に得られるよう製造・開発過程の透明性、倫理性には十分に配慮することが望まれると考える。

最後に、国策としての人工酸素運搬体の研究開発を真摯に受け止め、本基本的留意事項の策定を主導した血液代替物学会、ならびに策定の中心となられた東宝塚さとう病院名誉病院長の高折益彦先生に心から敬意を表したい。また、早期実用化が望まれる人工酸素運搬体の研究開発がさらに発展し、より加速することを心から祈念する。

引用文献

1. 高折益彦
“人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項”を解説する人工血液 2005;13(3) 104-109
2. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Clipolle M, Runge J, Mallory M., Rodman G: Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock : A randomized controlled efficacy trial JAMA 282:1857-1864,1999
3. United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research Point to Consider on Safety Evaluation of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers Transfusion 1991; 31: 369-371
4. United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research Guidance for Industry: Efficacy Evaluation of Hemoglobin- and Perfluorocarbon-Based Oxygen Carriers (DRAFT) Transfusion 1994; 34: 712-713
5. United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research National Institute of Health National Heart, Lung and Blood Institute United States Army Workshop on Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Cell Substitutes <http://www.fda.gov/cber/minutes/oxygen092799.htm>
6. United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research Guidance for Industry: Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitute <http://www.fda.gov/cber/blood/bldguid.htm>
7. 薬事研究会 編. 薬事制度の見直し及び新血液制度の概要 . 図解 2002年改正薬事法・血液法の概要 . じほう . 2002; 3-4, 58-61

FDAにおける人工酸素運搬体の 研究開発に関するガイダンスの要点

Regulatory Aspects for the Oxygen Therapeutics in the United States

川上浩司

Koji Kawakami

和文抄録

2004年10月に、米国食品医薬品局（U.S. Food and Drug Administration）の生物製剤評価研究センター（Center for Biologics Evaluation and Research）は、酸素運搬体としての赤血球代替物に関する性質、製造、非臨床試験、臨床適応に関するガイダンス（案）“Guidance for industry: Criteria for safety and efficacy evaluation of oxygen therapeutics as red blood cell substitutes(draft guidance)”を公表した。本ガイダンスでは、赤血球代替物による酸素治療の潜在的なベネフィットを理解した上での製造、そしてその有効性および安全性の指標ならびに評価のための臨床試験の計画について、行政当局としての考え方を示している。本総説においては、ガイダンスの背景と内容の主要点につき解説する。

Abstract

Center for Biologics Evaluation and Research of the U.S. Food and Drug Administration(FDA) issued "Guidance for industry: Criteria for safety and efficacy evaluation of oxygen therapeutics as red blood cell substitutes(draft guidance)" in October, 2004. In this draft guidance, FDA's current thinking about the suggested criteria for testing the efficacy and safety of oxygen therapeutics as substitutes for red blood cells, and guidance on the design of clinical trials to assess risk/benefit ratio of such use were described. In this manuscript, the background discussion and recommendations written in this guidance are explained in Japanese.

Keywords

Blood substitute, red blood cell, oxygen therapeutics, clinical indication, safety consideration

．ガイダンスの目的

近年、急速な勢いで酸素運搬体の様々な臨床応用に向けた開発が進められている。

特に、赤血球代替物による酸素治療のベネフィットとしては、万能な適合性・緊急使用・長期保存性が考えられる。2004年10月に、米国食品医薬品局（U.S. Food and Drug Administration; FDA）の生物製剤評価研究センター（Center for Biologics Evaluation and Research; CBER）が発表した“Guidance for industry: Criteria for safety and efficacy evaluation of oxygen therapeutics as red blood cell substitutes(draft guidance)”においては、赤血球代替物による酸素治療の有効性および安全

性の検討のための指標、ならびにリスク&ベネフィット評価のための臨床試験の計画について記載することにより、FDAによる当該分野の考え方を示している。

本稿においては、主要部分の日本語訳を行っている。米国での酸素運搬体の開発状況と我が国の現状とは異なる点も多々あることから、混乱を避けるために個々の推奨事項については割愛した部分もあることを了承されたい。

なお、本ガイダンスの全文は<http://www.fda.gov/cber/gdlns/oxytherbld.htm>にて公開されている。

．本ガイダンスに至る経緯

FDA当局は、血液代替物としての酸素運搬体の前臨床および臨床開発と評価について、以下のような通達や公知活動を行ってきた。

1990年8月 “Points to consider on the safety evaluation of hemoglobin-based oxygen carriers”

1997年9月 “Guidance for industry: Efficacy evaluation of hemoglobin- and perfluorocarbon-based oxygen carriers (draft guidance)”

1999年9月 “Criteria for safety and efficacy evaluation of oxygen therapeutics as red cell substitutes” FDA-CBER, アメリカ国立心肺・血液研究所, 防衛省, 陸軍医学物質学部隊, 軍血液プログラムオフィス共催のワークショップの開催(概要は <http://www.fda.gov/cber/minutes/oxygen092799.htm> および <http://www.fda.gov/cber/minutes/oxygen092899.htm> にて閲覧できる)

2004年10月発表の本ガイドラインは、上記の通達・ワークショップを踏まえて策定されたものである。なお、一般的なガイドライン等はFDAあるいはCBERガイダンス諸書類、International Committee on Harmonization (ICH) 諸書類を参照されたい。

．本ガイダンスの基盤背景

-A．総論

血液代替物としての酸素治療にはhemoglobin (ヘモグロビン) 由来のものおよびfluorochemical由来の合成物がある。

ヘモグロビン由来の酸素運搬体は、stroma-reducedヘモグロビン (通常, stroma-free ヘモグロビンと呼ばれる) を原材料として製造されるもので、期限切れヒト血液、ウシ由来血液またはrecombinant (人工合成) ヘモグロビンをクロマトグラフィー法により精製する。安定で機能性のある酸素運搬体として使用されるためには、そのような原材料から様々な化学的・遺伝子工学的修飾を経て製造される。最終的にはヘモグロビンのテトラマー分子内架橋体や、ヘモグロビントテトラマーの重合体、非タンパク質高分子に結合したヘモグロビントテトラマー、遺伝子的安定処理を施したヘモグロビントテトラマーなどのタイプがある。

Fluorochemical由来の酸素運搬体は、六員環構造の側鎖や直鎖に存在するCH基の水素原子がフッ素に置換されたものである。フッ素ではなく臭素に置換される場合もある。これらの化合物は界面活性物質 (サーファクタント) を含む電解質と混

合されることにより (perfluorochemical emulsions), 高濃度吸入酸素条件下で大量の非結合酸素を溶解することができる。

-B．安全性指標

現在開発中のヘモグロビン由来酸素運搬体の非臨床及び臨床試験においては、安全性に関して未解決の諸課題が数多く存在する。毒性を惹起するメカニズムに関してもまだ十分には解明されていない。しかしながら、今までの非臨床および臨床試験の経験から、ヘモグロビン由来酸素運搬体の最大の毒性として腎毒性が知られている。腎系球体で濾過される非修飾ヘモグロビン (分子量64000のnativeテトラマーヘモグロビン) は腎毒性の原因となるため、ヘモグロビン由来酸素運搬体の最終製剤とするべきではない。以上のような背景から、臨床試験の計画には、細胞代謝と酸素ラジカルまたは遊離鉄との相互作用が毒性の原因となりえるという仮説を考慮に入れることが推奨される。すなわち、細胞や組織への過剰あるいは不完全な酸素供給、ヘモグロビン由来酸素運搬体そのものの酸化作用が安全性に影響を及ぼするというのを念頭に入れる必要がある。

以下のような個々の臨床症候に留意されたい。

-B-1．血管反応性

細胞に結合していないヘモグロビンと一酸化窒素 (Nitric oxide; NO) との相互作用が血管炎症反応を惹起し、多臓器不全に至る可能性がある。

細胞に結合していないヘモグロビンがアドレナリン作動性受容体に作用し、血管収縮作用を有するペプチドであるendothelin-1を刺激する可能性がある。

修飾ヘモグロビン製剤の血圧への影響が小さなものであっても、有為に血管収縮と血圧抵抗性に寄与してしまうこともある。

-B-2．心毒性

動物実験においては、サルやブタにはヘモグロビン由来酸素運搬体が大きな心毒性を及ぼしやすく、イヌ、ヒツジ、ラットには心毒性をもたらさないという特徴がある。

動物実験においては、ヘモグロビン由来酸素運搬体の単回静脈内投与後24 - 48時間後に心筋細胞の軽 - 中程度の変化や多病巣性変性、壊死がみられるという報告がある。

-B-3．消化管系毒性

不快感として、悪心、嘔吐、嚥下障害、腹痛といった症候がある。これらはヘモグロビンにより一酸化窒素が消費されることによると考えられている。

動物実験によれば、ある種のヘモグロビン由来酸素運搬体を

投与することにより数分間以内で腸管絨毛の構造が変化することが報告されている。このため、腸管上皮を經由した細菌感染の発生や悪性化をおこす可能性がある。

-B-4. 炎症性変化

小動物においては、ヘモグロビン投与によって単球系の凝固活性が刺激され、血管内凝固が亢進する。

ウサギを用いた初期の動物実験においては、肺動脈炎や血栓が報告された（他の動物種では報告されていない）。

全血中成分存在下での白血球に対するヘモグロビンの作用を検討したin vitro実験においては、白血球からtumor necrosis factor (TNF) やインターロイキン 8 (IL-8) のような炎症前駆サイトカインが放出されることがわかっている。

-B-5. 酸化ストレス

ヘモグロビン溶液が酸化ストレスを誘発するという非常に多くの実験報告がある (in vitroおよびin vivo)。

酸化ストレスは、ヘモグロビンによって抗酸化機能を有する一酸化窒素が消費されることや、ヘモグロビンが有毒な酸素源となり得ることに起因する可能性がある。

臨床試験においてもクレアチンリン酸化酵素 (CK)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、リパーゼやアミラーゼのような膵酵素の酵素活性が上昇することが報告されている。

-B-6. 膵・肝臓系酵素の上昇

多くの動物実験における交換輸血時の膵・肝臓系酵素の上昇は、フリーラジカルに起因する障害であると推測されている。特にヘモグロビン投与時におけるリパーゼやアミラーゼの上昇は動物および患者にてしばしば観察される。

-B-7. エンドトキシンとヘモグロビンとの相乗作用

細菌由来のエンドトキシンとヘモグロビンとは、ヘモグロビンが臨床的有效量を投与される際に相乗作用的な毒性を示すことが報告されている。

ある種の敗血症動物モデルにおいて、ヘモグロビンとエンドトキシンとの直接的な生化学的相互作用により、循環血液からのエンドトキシンのクリアランスが減少し、致死率が上昇することが示されている。

感染症が進行する患者や開放創のある外傷患者にヘモグロビン由来酸素運搬体を投与する場合は、特に上記のようなリスクが懸念される。

-B-8. 神経毒性

クモ膜下出血の動物モデルの脳においては、変性部位にフリ

ーのヘモグロビンが存在するという多くの報告がある。

修飾ヘモグロビンが直接神経毒性を引き起こすという現象は、培養中の神経細胞がヘモグロビン添加によって死滅するという前臨床実験によって示されている（グリア細胞には影響しない）。

ある臨床試験においては、非細胞性のヘモグロビン製剤の使用は急性脳梗塞後3か月の予後不良な転帰と関連していたとのことである。この臨床毒性の発生メカニズムには、ヘモグロビンの投与量依存性に血管収縮性endothelin-1の作用が生じたことも寄与しているとの仮説が立てられている。

なお、perfluorochemical emulsionsの使用に関連した既知の毒性としては、(1) 血小板減少、(2) 補体の活性化とサイトカインの放出、(3) 網内系のブロックによる細菌除去能の低下、(4) 感冒様症状、(5) 中枢神経症状が報告されている。

-C. 効果指標

ヘモグロビン由来酸素運搬体の治療によるefficacy endpoint (効果指標) は、蘇生率の向上や症状緩和などの臨床的ベネフィットである。ただし、これらの臨床的ベネフィットを客観的に測定することは困難な場合もある。そこで、臨床的ベネフィットに直結する臨床検査や身体的兆候をsurrogate endpoint (代理指標) とすることができる。Surrogate endpointとしてはP₅₀、血中酸素量、ヘマトクリットといった酸素運搬体と臨床状態との相互作用による値が考えられるが、これらは効果測定のマーカーにはならないということに留意する。

なお、酸素運搬体は、FDAにより開発の“Fast Track”指定を受けることが出来る可能性がある。Fast Trackに関しては、1998年9月に発表された“Guidance for industry: Fast track drug development programs. Designation, development, and application review”を参照されたい。

酸素運搬体の使用法に際しては、いくつかの適応の可能性が考えられる。特に、以下の3つの項目を記載する。しかしながら、酸素運搬体の使用法はこの3種に限定されるというわけではなく、開発者側もこの分類を必ずしも適用する必要はない。

-C-1. 局所効果・局部における投与

冠動脈における血管形成術の施行時における使用、腫瘍の治療時の放射線感受性の増加を目標とした使用法が例として挙げられる。Percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) の施行時に経中心カテーテル的にperfluorocarbon preperation (Fluosol) を使用することはFDAの承認経験のある適応である。また、酸素運搬体を全身投与することにより腫瘍局所における酸素分圧が上昇すると、腫瘍の放射線療法や化学

療法に対する感受性が正常組織に比して増加することが報告されている。標的腫瘍における酸素分圧の上昇は、効果の判定において重要な surrogate マーカーとなる。ただし、本効能単独では効果指標としての primary endpoint とはならないことに留意する。最終的には、効果指標を判定するためのエンドポイントは腫瘍治療に用いる抗癌剤の評価と同様に設定することが望ましい。

-C-2. 手術時における使用

酸素運搬体を手術時に使用する場合には、被験者のリスクをよく勘案する必要がある。特に、酸素運搬体の輸液に際しては、自己のものではない (allogenic) ということに留意し、輸液量、血液動態、副作用となる薬物反応が起きる可能性を考えなければならない。全血輸血やエリスロポエチン輸血などに関しては、過去に FDA は輸血量を減らすという臨床試験計画を認めた経験もあるが、酸素運搬体の輸液に際しては、全血輸血などとの併用により被験者のリスクが必ずしも減少するとはいえない。更に、手術中あるいは手術後における酸素運搬体の使用は、血液希釈などを起こす可能性もある。以上により、個々の酸素運搬体制剤に応じて、生理学的な効果指標を設定する努力をすることを推奨する。

酸素運搬体制剤を待機手術での適応のみで評価することは、状態が不安定な患者や外傷患者における当該製剤の安全性の評価には不十分であるということにも留意する。

-C-3. 外傷

外傷においては、死亡率が酸素運搬体制剤の臨床的ベネフィットを考慮した有効かつ意義深いエンドポイントであると広く考えられている。短期間 (24-48 時間) の生存は酸素運搬体の生理学的活性の評価には有用であるが、長期間の生存こそが患者や患者の家族にとって第一義の臨床的ベネフィットである。また、現時点では、酸素運搬体の使用に際して、短期間の生存あるいは長期間の生存との関連性についての情報は不十分である。

外傷時の酸素運搬体の使用に際しては、インフォームトコンセントを患者あるいは法的に患者の代わりとなる者から取得することが可能となるような臨床試験計画を作成することを推奨する。医療施設においては、酸素運搬体の使用は生存期間を延長させるといよりも、短期的に赤血球輸血へのつなぎとして用いることが期待される。酸素運搬体を投与される殆どの患者は、血液成分の輸血を必要とするわけである。致死率という観点から酸素運搬体制剤の血液に対する非劣性を示すにあたっては、インフォームトコンセント取得が免除されるということにはなり得ない。

外傷時の酸素運搬体の使用には注意深く総合的な安全性評価が必要である。なぜならば、臨床試験を計画する上で、治療ベネフィットが得られる少数の被験者がいる場合には、それに加えて多くの被験者の生存ベネフィットを評価する必要があるからである。

都市部以外の郊外における臨床では、出血前や血液型検査を行う前のように、適切に組織に酸素を供給でき好気性代謝を維持することができる状態を一時的に保つことのできる治療方法というような用途で人工酸素運搬体の臨床的ベネフィットがあるかもしれない。

. 推奨事項

-A. 前臨床・非臨床評価

-A-1. 製剤の品質特性

酸素運搬体制剤の物理化学的としては、以下の10項目 (必要・十分とは限らない) の特性を解析することを推奨する。

- (a) 酸素含有量 (P_{50} , ヒル係数, ポーア効果, 塩素イオンや二酸化炭素効果). 生理学的に有用な PO_2 の範囲 (40-120 mm Hg) を上回る
- (b) 光学スペクトル
- (c) High pressure liquid chromatography (HPLC) によるサイズ, 電荷, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), sodium dodecylsulfate-PAGE (SDS-PAGE), iso-electric focusing (IEF)
- (d) 脂質およびリン脂質の含量および組成
- (e) エンドトキシン
- (f) 遊離鉄
- (g) メトヘモグロビン, スルフヘモグロビン, 一酸化炭素ヘモグロビン
- (h) 膠質浸透圧, 粘度 (軽度 - 中度の体温低下を考慮した温度条件下での検討)
- (i) pH
- (j) 電解質, 微量金属の同定および定量

また, in vitro における biological assay (生物学的解析) として, 酸素ラジカルの産生の解析, 酵素・細胞システムの活性化の解析 (補体・キニン・凝固カスケード, マクロファージ・好中球・血小板活性, ヒスタミン・トロンボキサン代謝物・ロイコトリエン・インターロイキンなどのメディエーターの放出) を推奨するが, これらは必要・十分な条件ではない。Biological assay を施行する際には, 製造バッチ間での品質の正確さを担保するために, 複数のバッチを用いて十分な回数 of 解析を行う必要がある。さらに, 製造ロットにおける biological

assayの施行基準や適切な規格を設定していくことが推奨される。

安定性試験 (stability test) に際しては、品質特性を示すパラメーターから適切な項目を選択し、適切なパラメーターを設定する。適切な保管条件 (高温における苛酷条件をふくむ) のもと、適切な保管間隔で開始時点 (initial) との比較を行う。

ヘモグロビン由来酸素運搬体の場合は、臨床試験において検討される生物学的活性を反映するpotency assayの方法を開発することを推奨する。血液代替としての酸素治療の場合、potency assayにはヘモグロビンの機能 (酸素結合能、運搬能、再結合能) の測定が必要である。

-A-2. 動物を用いた安全性試験

動物において酸素運搬体を用いた安全性試験を行う際には、一般的に、(a) 数種類の動物種 (イヌやブタのような大動物での検討は必須) を用いて慢性毒性を検討し、(b) 数ポイントの用量での毒性誘発試験を計画することが推奨される。また、酸素運搬体に対する免疫反応 (IgG, IgE反応, 反復投与時の遅延過敏反応など) も試験することを推奨する。

-A-3. 疾患動物モデルを用いた毒性試験

(a) 過剰負荷、交換輸血実験における安全性評価は、用量と毒性の相関関係や輸血代替への適応の判断材料となるが、必ずしも輸血代替使用以外の臨床使用や臨床上的輸血状況を十分に反映したものではない。

(b) 正常動物に加えて疾患動物モデルにおける試験を行うことで有意な情報が得られるが、疾患動物モデルでの実験は完全な安全性プロファイルを得るために特に必須である。試験施行に際しては、心肺機能を測定するための機器を植え込んだ動物での研究は臨床使用の準備に必要である。疾患例としては、蘇生適応のための大量出血モデル、PTCA適応のための虚血モデル、鎌状赤血球症適応のための反復投与モデル、SIRSショックモデル、心臓移植適応のための心肺バイパスモデルが考えられる。なお、PTCA適応のための虚血モデルにおいてヘモグロビン由来酸素運搬体を使用する際には、比較群として併用療法や併用薬剤投与群を設定することが推奨される。

(c) 再還流傷害モデルを用いた毒性の検討も必要である。このようなモデルは、虚血性疾患の臨床状態を反映する妥当な試験であるといえよう。

-A-4. 動物試験を行う際の重要な観察項目

(a) 微小循環および血管内皮への影響

(b) 腎への影響

血清クレアチニン, blood urea nitrogen (BUN) だけでは腎障害の評価には十分でない。腎動脈床における直接的な動脈圧および動脈血流の測定 (血管収縮), クリアランステスト (イヌリンや他の適切な薬剤), 糸球体の機能や構造を評価するための組織学的検査の併用が考慮される。ある種の動物モデルではクレアチニンの尿細管分泌量が不安定なため、クレアチニンクリアランスは糸球体機能の評価指標として十分でないことに留意する。

(c) 尿細管への影響

尿細管の機能や障害を評価するために、尿細管の尿蛋白や尿中酵素を測定する。

(d) 血液生化学的検査

Alanine aminotransferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), CK, Troponin, Troponin, LDH, クレアチニン, BUN, 電解質。なお、ヘモグロビンは比色定量分析を干渉することが確認されている。

(e) 血液学的検査

ヘマトクリット, ヘモグロビン, 白血球数 (WBC), 白血球分画, 血小板数, プロトロンビン時間 (PT), トロンボプラスチン時間 (APTT), フィブリノーゲン/フィブリン分離生成物, 第 因子

(f) 剖検後のすべての臓器の肉眼的, 顕微鏡的検査

その他の留意事項として、以下の点が挙げられる。

ヘモグロビン由来酸素運搬体の非臨床試験においては、酸化による傷害を信頼性の高いマーカーで測定することを推奨する。また、酸化前駆物質としての可能性 (pro-oxidant potential) は単一の生化学的検査で評価する必要がある。ヘモグロビンの分子内相互反応性、遊離鉄によるさまざまな傷害の出現、ヘムにより発生したフリーラジカル反応の確認も必要である。

心毒性を評価するために霊長類での実験が推奨される。心筋変性を評価しやすい疾患モデル動物を用い、心室中隔や乳頭筋の病理組織学的検討が必要である。

ヘモグロビン由来酸素運搬体では、培養神経細胞に対する時間的・濃度的な影響の検討が推奨される。また、血液脳関門 (blood brain barrier; BBB) が開放された状況での脳梗塞や脳障害モデルにおける検討が必要である。

化学修飾のための原料として使用されるstroma-reducedヘモグロビンの正確なヘモグロビン量, ヘモグロビン機能およびヘモグロビンの酸素運搬能や, 酸化還元活性を干渉する可能

性のある残存赤血球酵素の安定性を評価する必要がある。ヘモグロビン由来酸素運搬体は比色定量法により測定される臨床検査項目に干渉するため、臨床検査項目の新たな測定法や分析法による評価を検討する必要がある。

-B. 臨床的評価

-B-1. 総論

臨床応用は、脱水状態でない健康成人で低用量から開始されることとする。

ヘモグロビン由来酸素運搬体の投与量によっては瀉血を考慮する必要がある。

循環機能や免疫応答には細心の注意を払う必要がある。

炎症性メディエーター（補体/キニン/凝固系カスケード、ヒスタミンの放出、トロンボキサン代謝物、ロイコトリエンなど）のモニターが必要である。

開始投与用量での安全性が十分に確認された後に、注意深く健康成人に対する用量増加を行わなければならない。

健康成人での安全性が確立された後、適切な患者への適用が検討される。

患者は健康成人よりも有害事象に対する感受性が高い可能性がある。

安全性と有効性は、別々に評価されることが必要である。

安全性プロファイルの十分な情報を得た後、外傷および待機手術での安全性、有効性を評価する臨床開発計画を推奨する。外傷および待機手術における評価は、ベネフィットとリスクを広く理解する十分な情報を提供する。

FDAは、待機手術への適用のみがリスクを上回るベネフィットを生み出す適切な状況と考えている（この件に関する意見は広く学会・民間から募集する）。

特に毒性が危惧される臓器や組織をはじめとした全臓器に対する安全性を評価することが必要である。

不安定な手術患者や外傷患者への適用の前に、待機手術患者のような安定した患者での臨床試験を行うことが推奨される。

これまでに確認された酸素治療製剤における多くの有害事象は、一般手術患者で発生した有害事象と同様であった。この事実を鑑みて、一般手術患者における有害事象の頻度・強度の背景情報を考慮・検討するような臨床試験を計画することが推奨される。

脳挫傷や血液脳関門が破綻している可能性のある臨床状況への適用の可能性について検討する臨床試験の推進を推奨している。

-B-2. 待機手術

Phase 臨床試験の対象は、待機手術が施行される患者集団

を反映する必要がある。適応を一般手術に拡大する場合は、一般手術患者を対象とすることが必要となる。

術中および術後の通常輸血（同種輸血）の完全回避は、有効性評価のエンドポイントの一つになりうる。

最大投与用量（maximum tolerated dose; MTD）を決定するための安全性試験を行うことが必要である。MTD決定後、通常輸血（同種輸血）を回避するためという理由で毒性投与量を投与してはならない。

主要な有効性評価項目を通常輸血（同種輸血）の回避とする場合、副次的有効性評価項目として、すべての血液成分輸血の暴露量を設定することが必要である。

待機手術患者すべてにおいて通常輸血（同種輸血）を完全回避することはできないかもしれないが、適切な試験計画は2単位以上の赤血球が必要な患者が対象である。

診療上（ベッドサイド）で日常的に体内循環中のヘモグロビン由来酸素運搬体および赤血球量を把握できる評価ガイドラインを作成することが推奨される。

ヘモグロビン由来酸素運搬体を投与された患者において、ヘマトクリット値は出血患者の臨床状況を正確には反映しない。

ヘモグロビン由来酸素運搬体は追加輸血の必要性を判断する全ヘモグロビン量の日常的な測定を妨げる可能性がある。

ヘモグロビン由来酸素運搬体の開発者は、被験者および治験担当医師に対しリスクについて十分に説明しなければならない。また、臨床現場での赤血球輸血の使用にも不確定なリスクが存在することを説明しなければならない。

ヘモグロビン由来酸素運搬体と赤血球との間に統計学的に意義のある相対的な安全性があるかを評価する臨床試験は非常に大きなサンプルサイズとなるため、現時点では、FDAはヘモグロビン由来酸素運搬体が赤血球と同等の安全性であるかどうかを適度な（中程度の規模の）臨床試験で評価することを許可している。

-B-2. 外傷

死亡率の代替指標を検討する必要がある。死亡率の代替指標は、臨床的ベネフィットが期待できる臨床検査または身体的な徴候の可能性もある。現状では、外傷の臨床評価の一般的な指標は合意を得てはいない。

血液が入手できる環境において、血液に対し人工酸素運搬体が臨床的に劣らないことを評価する臨床試験は、出血がコントロールされるまでの赤血球の代替目的に限って可能である。

臨床評価（死亡率、症状の持続）における赤血球に対する非劣性の検討は、外傷を適用とすることが適切かもしれない。しかし、このような臨床試験での広範な使用状況が、死亡率、病状の持続、その他の安全性評価に影響を及ぼしかねないため大きなサンプルサイズが要求される。

被験者の多くにインフォームドコンセントを提供できず、法

的に権限を与えられた代弁者がいない状況での臨床試験計画では、試験に登録される患者集団が臨床現場における患者の適切な代表集団でない可能性がある。このような状況での安全性と有効性を直接的に確認する臨床試験は、既承認の血液蘇生液をコントロールとして使用し、生存を主要評価項目とした試験となる。

患者に直接的なベネフィットをもたらす可能性がある場合は、このような緊急使用目的の臨床試験ではインフォームドコンセントの取得を例外とする可能性がある。

大量出血患者以外では、より生存率が高く求められるような大規模試験が必要となる可能性がある。

血液が入手または使用できない状況での有効性の評価は、血液が入手でき使用された病院での比較試験のコントロール群における臨床試験データによりサポートされる可能性がある。しかしながら、出血がコントロールできない状況での救急室や手術室でのデータの使用は困難である。

外傷治療または病院内での緊急的な大量出血に対するヘモグロビン由来酸素運搬体の安全性と有効性が確認されたとしても、明らかな治療の遅れや、血液損失が致命的であった場合に用いられる既存の血液蘇生液を超えるメリットがあることが期待される。

<最後に>

本稿においては、2005年6月6日に行われた第12回日本血液代替物学会での発表に基づいてガイダンスの要点を抄訳した。和訳・解説してみると、人工酸素運搬体の研究開発は米国において長い歴史があり、その臨床応用に際しての問題点が経験として蓄積されてきたことが印象的であった。わが国においても、人工酸素運搬体の臨床使用に向けた研究開発が着実にすすんでいる。現時点では日本国内では人工酸素運搬体の臨床試験は未だ行われていないが、いくつかの候補物が使用されるようになることで、規制当局の対応や国内固有の問題点も明らかになっていくと予想される。その際にFDAの本ガイダンスはきわめて有用な開発の手引きとなる。

<謝辞>

本総説の執筆にあたっては、バイオアクセラレーター株式会社代表取締役社長の小澤健夫氏にご協力を仰ぎましたので、ここに深謝いたします。

ポリ(エチレングリコール)修飾アルブミン-ヘム： 酸素輸送血漿増量剤としての溶液物性と機能

Poly(ethylene glycol)-Conjugated Albumin-Heme: Solution Properties and Functions as O₂-Carrying Plasma Expander

小松晃之⁽¹⁾, 黄宇彬⁽¹⁾, 王荣民⁽¹⁾, 中川晶人⁽¹⁾, 山本尚志^(2,3), 堀之内宏久⁽³⁾, 小林紘一⁽³⁾, 土田英俊⁽¹⁾

Teruyuki Komatsu⁽¹⁾, Yubin Huang⁽¹⁾, Rong-Min Wang⁽¹⁾, Akito Nakagawa⁽¹⁾, Hisashi Yamamoto^(2,3),

Hirohisa Horinouchi⁽³⁾, Koichi Kobayashi⁽³⁾, Eishun Tsuchida⁽¹⁾

和文抄録

組換えヒト血清アルブミン(HSA)にテトラ(*o*-アミドフェニル)ポルフィリン鉄(Fe4PまたはFe3P)を包接したアルブミン-ヘム複合体(HSA-FeXP)は、生理条件下で酸素を可逆的に結合解離できる合成ヘム蛋白質である。我々はその分子表面にポリ(エチレングリコール)(PEG)鎖を共有結合で導入した新しい人工酸素運搬体“PEG修飾HSA-FeXP”を合成し、その構造、物理化学的特徴、酸素結合能、生体内酸素輸送能の詳細を明らかにした。本稿では、PEG修飾アルブミン-ヘムの最新的话题を紹介したい。PEG鎖の導入は、リシンのアミノ基を2-イミノチオラン(IMT)でチオール基へ変換後、そこへ *-*マレイミド- *-*メトキシPEG [PEG_{MY}, 分子量 2 kDa (PEG_{M2}) または 5 kDa (PEG_{M5})] を反応させる方法、もしくは *-*スクシンイミド- *-*メトキシPEG [PEG_{SY}, 分子量 2kDa (PEG_{S2}) または 5 kDa (PEG_{S5})] をリシンのアミノ基と直接反応させる方法により行った。MALDI-TOF MSには明確な分子イオンピークが現れ、その質量数からPEG鎖の結合本数を決定した。PEG_{MY}(HSA-FeXP)の場合、残存するチオール基の定量からも平均PEG結合本数が算出できる。PEG (2 kDa) で修飾したHSA-FeXP溶液(リン酸緩衝生理食塩水, [HSA] 5 g/dL)の溶液粘度、コロイド浸透圧は未修飾体と同等であったが、PEG (5 kDa) 修飾体の値は顕著に増大した。PEG鎖の導入はFeXPの酸素結合速度を低下させる一方、酸素錯体の安定度を向上させた。ラットへPEG_{MY}(HSA-FeXP)溶液を投与した後のFeXPの血中滞留時間は13 - 16 hrであった。また、ラット脱血ショックモデルを用いた蘇生試験では、HSA投与対照群に比べ、生存時間、呼吸循環器系パラメーター、組織酸素分圧、血液ガスパラメータに回復効果が見られた。HSA-FeXPの分子表面をPEG鎖で修飾すると、*in vitro*, *in vivo*における酸素運搬能が改善されることが明らかとなった。PEG_{MY}(HSA-FeXP)溶液は、臨床利用可能な酸素輸送血漿増量剤として期待される。

Abstract

Albumin-heme hybrid composed of human serum albumin(HSA)incorporating tetrakis(*o*-amidophenyl)porphinatoiron(II) (Fe4P or Fe3P) (HSA-FeXP) is a unique artificial hemoprotein which can reversibly bind and release oxygen(O₂) under physiological conditions. We have introduced poly(ethylene glycol) (PEG) chains into the molecular surface of albumin-heme by covalently bond to produce a new artificial O₂-carrier "PEG conjugated albumin-heme", and clarified its structure, physicochemical properties, O₂-binding properties and O₂-transporting ability *in vivo*. This review describes the latest results from our research on PEG conjugated HSA-FeXP. The HSA-FeXP has been modified by maleimide- or succinimide-terminated PEG. 2-Iminothiolane reacted with the amino groups of Lys to create active thiol groups, which bind to *-*maleimide- *-*methoxy PEG [Mw: 2-kDa(PEG_{M2}) 5-kDa(PEG_{M5})] On the other hand, *-*succinimidyl- *-*methoxy PEG [Mw: 2-kDa(PEG_{S2}) 5-kDa(PEG_{S5})] directly binds to Lys residues. MALDI-TOF MS of the PEG conjugated HSA-FeXP showed distinct molecular ion peaks, which provide an accurate number of the PEG chains. In the case of PEG_{MY}(HSA-FeXP) the spectroscopic assay of the thiol groups

(1) 早稲田大学理工学総合研究センター, 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1, Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555

(2) ニプロ株式会社医薬品研究所, 〒525-0055 滋賀県草津市野地町3023

(3) 慶応義塾大学医学部呼吸器外科, 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

論文受付 2006年6月19日 論文受理 2006年7月20日

also provided mean of the binding numbers of the polymers. The viscosity and colloid osmotic pressures of the 2-kDa PEG-conjugates(phosphate buffered saline solution, [HSA]= 5 g dL⁻¹) were almost the same as that of the non-modified one, whereas the 5-kDa PEG binding increased the rheological parameters. The presence of flexible polymers on the HSA surface retarded the association reaction of O₂ to FeXP, and stabilized the oxygenated complex. Furthermore, PEG_M(HSA-FeXP) exhibited a long circulation lifetime of FeXP in rats(13 - 16 h) The physiological responses to an exchange transfusion with PEG_{M2}(HSA-Fe4P) into an acute anemia rat model showed significant recovery effects on survival time, circulation parameters, blood parameters and muscle tissue oxygen partial pressure. On the basis of these results, it can be concluded that the surface modification of HSA-FeXP by PEG has improved its comprehensive O₂-transporting ability. In particular the PEG_M(HSA-FeXP) solution could be a promising material for entirely synthetic O₂-carrying plasma expander as a red cell substitute.

Keywords

Poly(ethylene glycol) human serum albumin, albumin-heme, oxygen-carrier, plasma expander, red cell substitute

1 . はじめに

ポリ(エチレングリコール)(PEG) は、ペプチド、蛋白質、酵素、リン脂質ベシクルの表面修飾剤として一般に広く利用され、様々な付加価値を与えることが知られている。血中半減期の延長、抗原性の回避のみならず、面白いところでは有機溶媒に対する溶解性の付与や耐熱性の向上などがある^{1,4)}。人工酸素運搬体としてのPEG修飾ヘモグロビン(Hb) の開発も継続されており⁵⁻⁸⁾、現在、最適化された製剤について臨床試験が進行している。他方、ヒト血清アルブミン(HSA) は、血漿中に高濃度(4 - 5 g/dL) に存在する多機能蛋白質である⁹⁾。我々は、テトラ(*o*-アミドフェニル) ポルフィリン鉄(II) 誘導体(Fe4PまたはFe3P, Chart 1) をHSAに包接させたアルブミン-ヘム複合体(HSA-FeXP) が、生理条件下(pH 7.4, 37) で酸素を可逆的に吸脱着できることを見出し¹⁰⁾、出血ショックモデルラットへの投与実験から、HSA-Fe4Pの安全性と生体内酸素輸送能を明らかにしてきている¹¹⁾。HSA-FeXPに残された唯一の課題は、FeXPがHSAの疎水ポケットに非共有結合で包接されているため(結合定数K: 10⁴ - 10⁶ M⁻¹)、血中へ投与すると蛋白質骨格から解離し易いことにある。天然のヘム(プロトポルフィリンIX (FePPIX) 鉄) もHSAに取り込まれるが(K値はFeXPの10² - 10⁴倍と高い)²⁾、血液循環系では2.5 - 3.6時間の半減期でHSAから離脱する¹³⁾。そこで我々は、HSA-FeXPの分子表面をPEG鎖で修飾すれば、FeXPの解離が抑制され、酸素運搬能を長時間持続させることができるのではないかと考えた。HSAは血漿蛋白質として古くから研究されているものの、PEG修飾の化学についてはあまり知られていない。種々の薬物がHSAに包接されて体内循環することは周知の事実であり⁹⁾、PEG修飾によりHSAに結合した薬物の血中濃度をコントロールすることができれば、薬効制御の点からも大変有効な方法論になろう。

本稿では、PEG修飾HSA-FeXP [PEG (HSA-FeXP)] の構造、物理化学的特徴、酸素結合能、生体内酸素輸送能に関する著者らの最近の成果を概説する。PEG鎖による表面修飾は、HSA-FeXPの溶液粘度、コロイド浸透圧(COP)、酸素結合挙動およびFeXPの血中滞留時間に大きな影響を及ぼす。PEG修飾HSA-FeXPは、臨床利用可能な赤血球代替物または酸素治療

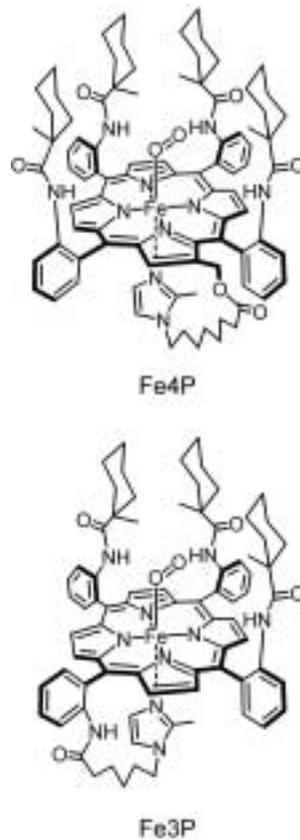


Chart 1. Structures of O₂-adduct complexes of tetrakis(*o*-amidophenyl) porphinatoiron(II)

薬としてきわめて有用な製剤として期待される。

2 . PEG修飾アルブミン-ヘムの調製と構造

HSA-FeXPは片末端に活性基を有するマレイミドPEGまたはスクシンイミドPEGにより、室温で簡便に表面修飾することができる。IMTは定量的にリシンのアミノ基と反応し活性チオール基を生成、これが -マレイミド- -メトキシPEG (PEG_{M2}またはPEG_{M5}) と反応する(Fig. 1)。この2段階反応は再現性が良く、副生成物もない。一方、 -スクシンイミド- -メトキシ

PEG (PEG₃₂またはPEG₅₅) は、リシンのアミノ基と直接反応する。

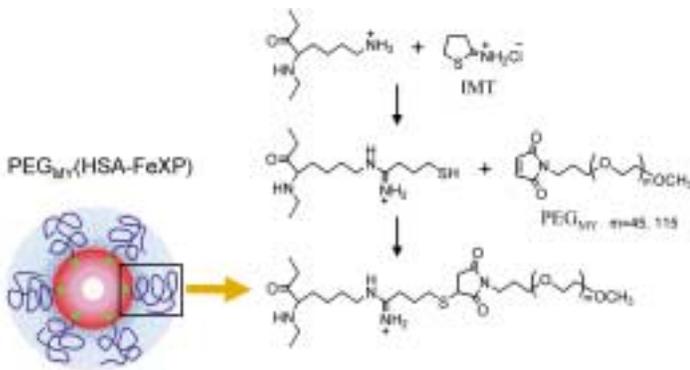


Fig. 1. Two-step reaction schemes of IMT and maleimide-PEG(PEG_{M5}) with HSA-Fe4P.

PEG_{M5}(HSA-Fe4P) (仕込み比: [IMT]/[HSA-Fe4P]=15/1 (mol/mol)) のMALDI-TOF MSを測定すると、85, 90, 95, 101, 106 kDaに5つの明確なピークが現れた (Fig. 2.A). 未反応のHSA-Fe4Pは存在せず、各質量数の差が5.25 kDa間隔であることから、HSA-Fe4PにPEG_{M5}が間違いなく共有結合しており、それぞれのピークは異なるPEG結合本数を有するPEG_{M5}(HSA-Fe4P)の分子イオンに相当すると考えられた。ここで注意しなければならないことは、各質量数にFe4Pの分子量が含まれるかどうかである。HSA-Fe4PのMALDI-TOF MS測定では、HSA由来のピーク (66.5 kDa) のみが観測され、HSAに包接されたFe4Pは、イオン化の途中で蛋白質内部から解離してしまうことがわかっている (10a)。我々は、HSA-FeXPにおけるPEG鎖の平均結合本数をHSAとチオール基の定量分析から算出する方法を確立した。一般に、HSA濃度は280 nmの吸光度、またはブロムクレゾールグリーン法により決定できるが¹⁵⁾、それらの方法はPEG鎖で表面修飾した場合、少なからず阻害されるものと予想される。そこで、HSA濃度の定量にCDスペクトル測定を利用した。HSA溶液とPEG修飾HSA溶液のCDスペクトルを比較したところ、HSA由来のモル楕円率 ($\epsilon_{208} = 1.9 \times 10^4 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) がPEG鎖結合の前後で変わらないことを見出した。つまり、PEG修飾HSA-FeXPのHSA濃度は、208 nmにおけるCD強度から正確に決定できるのである。一方、蛋白質上のチオール基は2,2'-DTPを用いたジスルフィド交換反応で定量することができる¹⁶⁾。これら2つの方法を組み合わせることにより、HSA-FeXPにおけるチオール基数の算出が可能となった。IMTと反応 ([IMT]/[HSA-Fe4P]=15 (mol/mol)) させた直後のHSA 1分子当たりのチオール基平均数は6.7であるが、PEG_{M5}との反応後 ([PEG]/[HSA-Fe4P]=20 (mol/mol)) は0.6に減少した (Table 1.)。つまり、平均6.1個のチオール基がPEG_{M5}と反応していることになる。MSのピーク強度から算出したPEG_{M5}(HSA-Fe4P)の平均質量数 (95 kDa) からPEG鎖6本分の分子量 (5 kDa×6 = 30 kDa) を差し引くと65 kDaとなり、これはHSA単独の分子量に等しい。以上の結果から、

MALDI-TOF MSで観測された分子イオンピークにはFeXPの分子量は含まれないことがわかった。以下、分子表面に5 kDaのマレイミドPEGが平均6本結合したHSA-Fe4PをPEG_{M5-6}(HSA-Fe4P)と略記する。

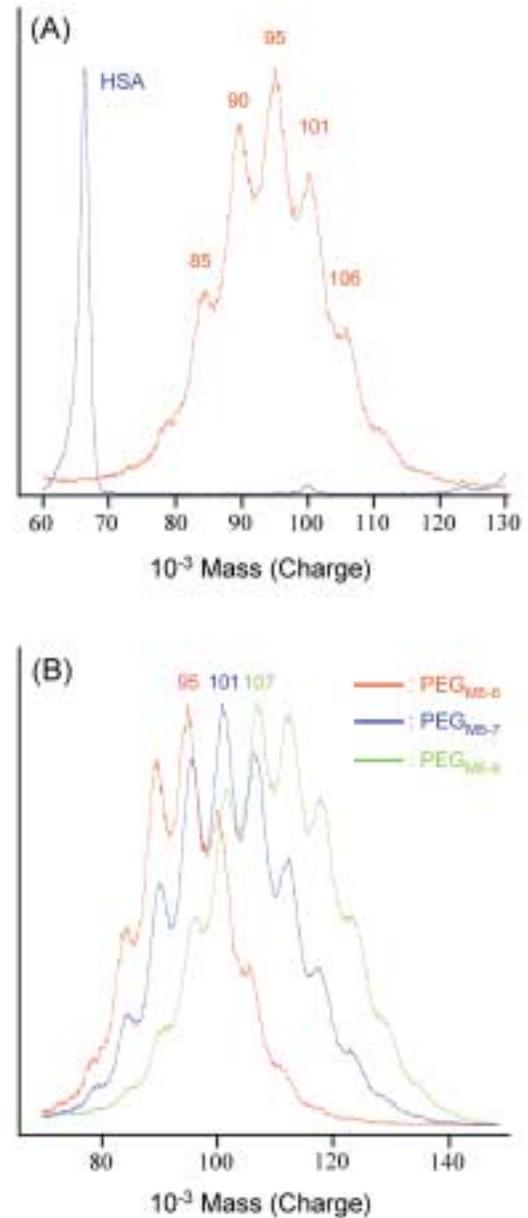


Fig. 2. MALDI-TOF MS of (A) HSA and PEG_{M5-6}(HSA-Fe4P) and (B) PEG_{M5}(HSA-Fe4P) prepared in different [IMT]/[HSA-Fe4P] ratios of 15 (red) 20 (blue) and 30 (green) mol/mol

Table 1. The mean of thiol groups per HSA-Fe4P molecule and binding number of the PEG chains.

PEG	[IMT]/[HSA-Fe4P] mol/mol	Thiol groups per HSA after IMT addition (A)	Thiol groups per HSA after PEG binding (B)	Decreased thiol groups(B)-(A) ^a	Averaged PEG number from MS
PEG _{M2}	10	5.6	0.5	5.1	4.6
	15	6.6	0.9	5.7	5.7
	20	8.3	1.1	7.2	6.6
PEG _{M5}	15	6.7	0.6	6.1	5.9
	20	8.0	0.9	7.1	7.2
	30	9.3	1.1	8.2	8.3

^aThis number corresponds to the binding numbers of PEG_{MV} on the protein surface.

HSA-Fe4Pに対するPEG_{M5}の結合本数は、HSA-Fe4PとIMTの仕込み比により調節できる。IMT量を増加させるに従い、PEG_{M5}(HSA-Fe4P)の最大分子イオンピークは高質量数側95 101 107 kDaへと移行した。全体のピークパターン(分子量分布)に変化が見られないことは興味深い(Fig. 2.B)。分子イオンピーク強度から推定したHSA当りのPEG結合本数は、チオール基の定量から算出した値とよく一致した(Table 1.)。

一方、PEG_{M2}(HSA-Fe4P)の場合、PEG_{M5}修飾体に比べ各ピーク質量数の差が小さいため、単一ブロードピークとして観測される。この場合も仕込んだIMT量の増加により、最大ピーク位置は高質量数側へと移行した(Fig. 3, Table 1.)。

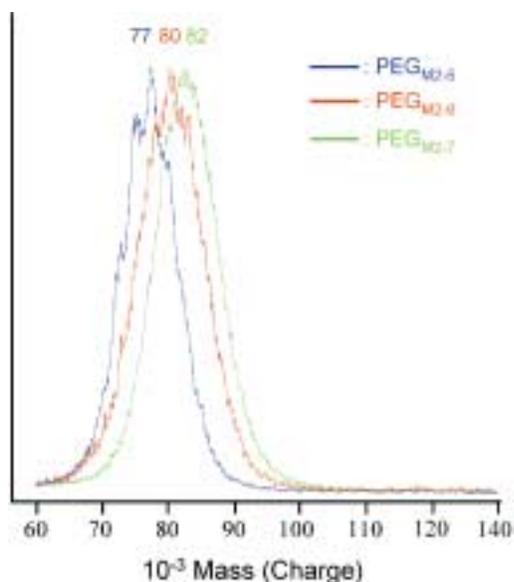


Fig. 3. MALDI-TOF MS of PEG_{M2}(HSA-Fe4P) prepared in different [IMT]/[HSA-Fe4P] ratios of 10(blue) 15(red) and 20(green) (mol/mol)

スクシンイミドPEGで修飾したPEG_{S5}(HSA-Fe4P)のMALDI-TOF MSも、PEG_{M5}(HSA-Fe4P)と同様なピークパ

ターンを示した。PEG_{S2}(5 kDa)の仕込み比を増やすと([PEG_{S5}]/[HSA-Fe4P]=10, 20, 30 (mol/mol)), 蛋白質当りのPEG_{S5}平均結合本数は4 5 6と上昇した(平均結合本数はMSの平均質量数からHSAの分子量を差し引き、PEGの分子量で除した値とした)。しかし、PEG_{S2}(2 kDa)の場合、仕込み量([PEG_{S5}]/[HSA-Fe4P]=10 - 20 (mol/mol))に関係なく、結合本数は常に6であった。これはスクシンイミド基の一部が水中で加水分解しているためと推測される。分子表面に2 kDaのスクシンイミドPEGが平均6本結合したHSA-Fe4PをPEG_{S2.6}(HSA-Fe4P)と略記する。

また、CDスペクトルから定量した[HSA]および、ICPから定量した[FeXP]の値から、PEG修飾の前後でHSA/FeXPのモル比4 (mol/mol)が変わらないことを確認した。

3. 溶液物性

PEG (2 kDa) で修飾したPEG_{M2}(HSA-FeXP), PEG_{S2}(HSA-Fe4P) (PBS溶液, [HSA] 5 g/dL, pH 7.4) の溶液粘度とCOPはPEG鎖の結合本数に関係なく、未修飾体とほぼ同じ値であった。これに対しPEG (5 kDa) で修飾したPEG_{M5}(HSA-FeXP), PEG_{S5}(HSA-Fe4P) (PBS溶液, [HSA] 5 g/dL, pH 7.4) は、HSAやHSA-FeXPに比べ高粘度(2.30 - 2.34(ずり速度230 s⁻¹)), 高COP値(45 - 65 mmHg)を示した。輸血代替を目的とした場合、COPはヒト血液に等しいことが望ましいが、血漿増量剤としての効果を強調するためには、生理的条件より幾分高いCOPにすることも有効であろう¹⁷⁾。血液粘度の維持が微小循環系におけるずり応力の保全に重要な役割を果していることも提唱されている¹⁸⁾。溶液粘度とCOPの値が表面に導入するPEG鎖の分子量(2 kDa, 5 kDa)で制御できる特徴は、PEG修飾HSA-FeXPの大きな利点である。

4. 酸素結合能

窒素雰囲気下におけるPEG_{M2}(HSA-Fe4P)の紫外可視吸収スペクトルは、 λ_{max} : 441, 537, 563 nmを示し(Fig. 4.)、これはFe4Pが2-メチルイミダゾリル基を分子内配位して、Fe(II) 5

Table 2. Solution properties of PEG-conjugated HSA-FeXP solutions at 37 (pH 7.4, [FeXP] = 3 mM)

PEG	Density (g/cm ³)	Viscosity (cP)	COR (mmHg)
PEG _{M2-5} (HSA-Fe4P)	1.01	1.08	22
PEG _{M2-6} (HSA-Fe4P)	1.01	1.14	27
PEG _{M2-7} (HSA-Fe4P)	1.01	1.17	28
PEG _{M2-6} (HSA-Fe3P)	1.01	1.14	26
PEG _{M5-6} (HSA-Fe4P)	1.01	2.34	65
PEG _{S2-6} (HSA-Fe4P)	1.01	1.14	22
PEG _{S5-6} (HSA-Fe4P)	1.01	2.30	45
HSA-Fe4P	1.01	1.05	21
HSA	1.01	1.00	21

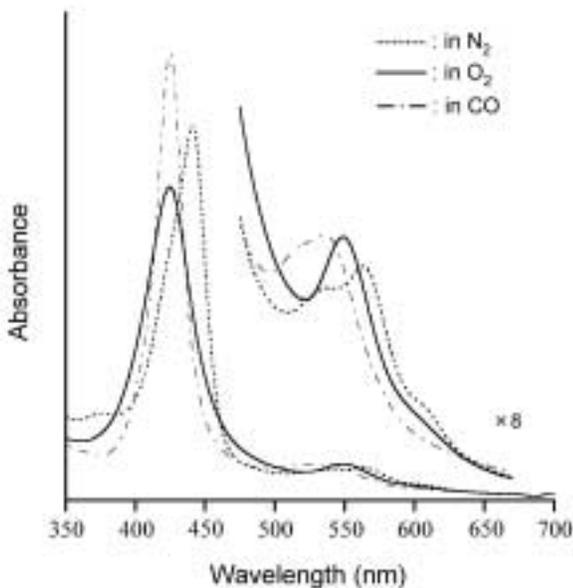


Fig. 4. UV-vis. absorption spectral change of PEG_{M2-6}(HSA-Fe4P) in PBS solution (pH 7.4)

配位高スピン錯体を形成していることを示している(10b,c,19). ヘム鉄の配位構造としては、ヘモグロビン、ミオグロビンのデオキシ体相当するが、スペクトルパターンや λ_{max} 値 (434, 557 nm²⁰) が異なるのは、活性中心であるポルフィリンの骨格構造が異なるためである. そこへ酸素を通気すると、スペクトルは速やかに酸素錯体型へ移行し (λ_{max} : 424, 550 nm) (10b,c,20), 酸素結合解離は酸素分圧に応答して可逆的に生じた. また、一酸化炭素を通気すると、PEG_M(HSA-FeP) は安定な一酸化炭素錯体を形成した (λ_{max} : 425, 535 nm). 全てのPEG修飾HSA-FeXP溶液は同様なスペクトル変化を示した.

レーザーフラッシュホトリシス後の吸光度変化から、PEG修

飾HSA-FeXPの酸素結合速度定数 (k_{on}) を決定した²⁰). HSA-FeXPの酸素結合反応はFeXP近傍の分子環境(アミノ酸残基による立体障害や空間の極性)に影響を受ける結果、速い過程(結合速度定数 k_{on} (fast))と遅い過程(結合速度定数 k_{on} (slow))の2成分から構成される(10c-e). このHSA-FeXPに見られる特性は、PEG修飾後も変わることなく、全ての酸素結合過程は二相性の反応として観測された. 興味深いことに、PEG修飾HSA-FeXPの k_{on} (fast) は、対応するHSA-FeXPの1/1.9 - 1/3.3低い値を示した. HSA表面の柔軟なPEG鎖が、酸素分子の拡散を抑えているためと考えられる.

PEG修飾HSA-FeXPの $P_{1/2}[K(O_2)]^1$ は、O₂/N₂滴定による紫外可視吸収スペクトル変化から決定した (Table 3). PEG修飾HSA-FeXPの $P_{1/2}$ 値は、もとの未修飾体と同等であり、FeXPの酸素配位平衡はPEG鎖に影響を受けないことがわかった. 速度論的には、酸素の結合速度と解離速度がいずれも減少しているためと説明できる(10c). 一方、PEG修飾によりFeXO₂錯体のプロトン酸化は抑制され、酸素錯体の半減期 [$t_{1/2}(O_2)$] は延長された. とりわけ、PEG_{M5-6}(HSA-Fe4P)のO₂が最も長い ($t_{1/2}(O_2)$) (16 hr, 37 °C)を示し、この値は天然ヘム蛋白質であるミオグロビン (12 hr, pH 7, 37 °C)の値をも上回った²¹).

5. 血中滞留時間(ラット)

PEG_M(HSA-FeXP)およびPEG_S(HSA-Fe4P)溶液をラットへ投与(20%循環血液量相当)し、FeXPの血中残存率を測定した (Fig. 5). PEG_M(HSA-FeXP)投与後のFeXPの消失過程は一次反応に従い、血中半減期はPEGの分子量、FeXPの構造に関わらず12.9 - 15.8 hrと長かった²²). PEG鎖による表面修飾が、予想通りFeXPの解離を抑制しているためと推測される.

他方、PEG_S(HSA-Fe4P)投与後のFe4Pの減衰曲線は二相性を示し、 $t_{1/2}$ 値は1.5 - 2.1 hrに留まった. これら半減期の違いは、表面電荷およびPEG結合位置の相違によるものと考えら

Table 3. O₂-Binding parameters of PEG-conjugated HSA-FeXP solution at 25 (pH 7.4)

System	k_{on} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		k_{off} (ms^{-1})		$P_{1/2}^a$ (Torr)	$t_{1/2}$ (h) at 37
	fast	slow	fast	slow		
PEG _{M2-5} (HSA-Fe4P)	11	5.8	0.16	0.08	11(38)	13
PEG _{M2-6} (HSA-Fe4P)	12	4.6	0.17	0.07	11(32)	12
PEG _{M2-7} (HSA-Fe4P)	9.3	4.7	0.16	0.08	13(35)	12
PEG _{M2-6} (HSA-Fe3P)	15	4.2	0.52	0.14	26(41)	8
PEG _{M5-6} (HSA-Fe4P)	12	6.2	0.17	0.09	11(31)	16
PEG _{S2-6} (HSA-Fe4P)	10	4.3	0.14	0.06	11(36)	13
PEG _{S5-6} (HSA-Fe4P)	12	5.5	0.25	0.11	16(32)	18
HSA-Fe4P	31	7.3	0.53	0.13	13(34)	9
HSA-Fe3P	29	4.4	1.1	0.16	22(45)	4

^aThe numbers in parenthesis are $P_{1/2}$ (Torr) at 37 .

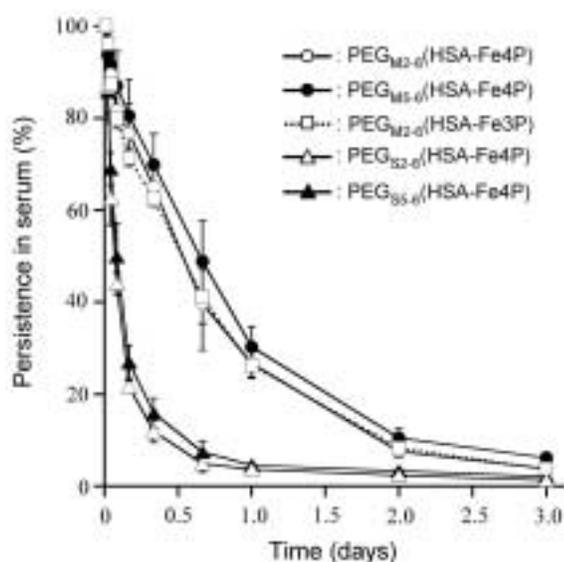


Fig. 5. Persistence of FeXP in serum after administration of PEG conjugated HSA-FeXP into Wistar rats. All values are mean \pm S.D.(n=4)

れる。現在、FeXPを含まないPEG修飾HSAの血中滞留時間を観測するなど、詳細な検討を実施している。

6. 酸素輸送血漿増量剤としての効果

ラット脱血ショックモデルを用いて、PEG_{M2-6}(HSA-Fe4P)の生体内酸素輸送能を評価した。推定総血液量の65%をHSAで交換し、さらに30%量を脱血、等量のPEG_{M2-6}(HSA-Fe4P)溶液を静脈内投与して、2時間後までの生存時間、呼吸循環器系パラメーター、組織酸素分圧、血液ガスパラメータを測定した²³⁾。対照はHSA投与群と洗浄赤血球 (Hb濃度 5 g/dL : Fe4Pのへ

ム鉄濃度相当量)投与群とした。脱血終了後、平均血圧、心拍数、呼吸数、組織酸素分圧(腎皮質及び外腹斜筋)、PaCO₂およびPvO₂が低下し、PaO₂、pH及び乳酸濃度の上昇が認められた。HSAの投与だけでは、これらの変化を改善することなく、投与終了後42分以内に5例全例が死亡した(Fig. 6.A)。一方、洗浄赤血球を投与すると、全ての数値がほぼ脱血前値にまで回復し、5例全例が投与終了120分後まで生存した。PEG_{M2-6}(HSA-Fe4P)の投与では、投与終了後に平均血圧、心拍数、呼吸数、外腹斜筋酸素分圧、PaO₂、PaCO₂、PvO₂および乳酸濃度が脱血前値まで回復した(Fig. 6.B-D)。投与終了後120分までに5例全例が生存し、酸素輸送能を有する血漿増量剤としての効果が実証された。

7. まとめ

合成ヘム蛋白質HSA-FeXPの分子表面をPEG鎖(分子量: 2 kDa または5 kDa)で修飾すると、in vitro, in vivoにおける酸素輸送能が改善される。PEG修飾は酸素結合速度を低下させるが、不可逆酸化を抑制するため、酸素錯体の安定度を増大させる。5 kDa PEGによる修飾では、溶液粘度、COPが上昇するものの、2 kDa PEGの場合、これらの値に大きな変化は見られない。FeXPの血中滞留時間は、PEG鎖の結合様式に大きく依存した。特にPEG_M(HSA-FeXP)の半減期はPEG_S(HSA-FeXP)に比べると6 - 8倍に延長された。また、脱血ショックモデルを用いた蘇生試験から、PEG_M(HSA-FeXP)溶液が酸素輸送血漿増量剤として有用な製剤となり得ることが示された。

我々はごく最近、PEG_M(HSA-FeXP)溶液をガラス板に滴下し、水を蒸発させると、赤色透明薄膜が得られることを見出した。この薄膜は窒素雰囲気下でFe(II) 5配位高スピン錯体(デオキシ体)を形成し、空气中へ出すと酸素を可逆的に吸脱

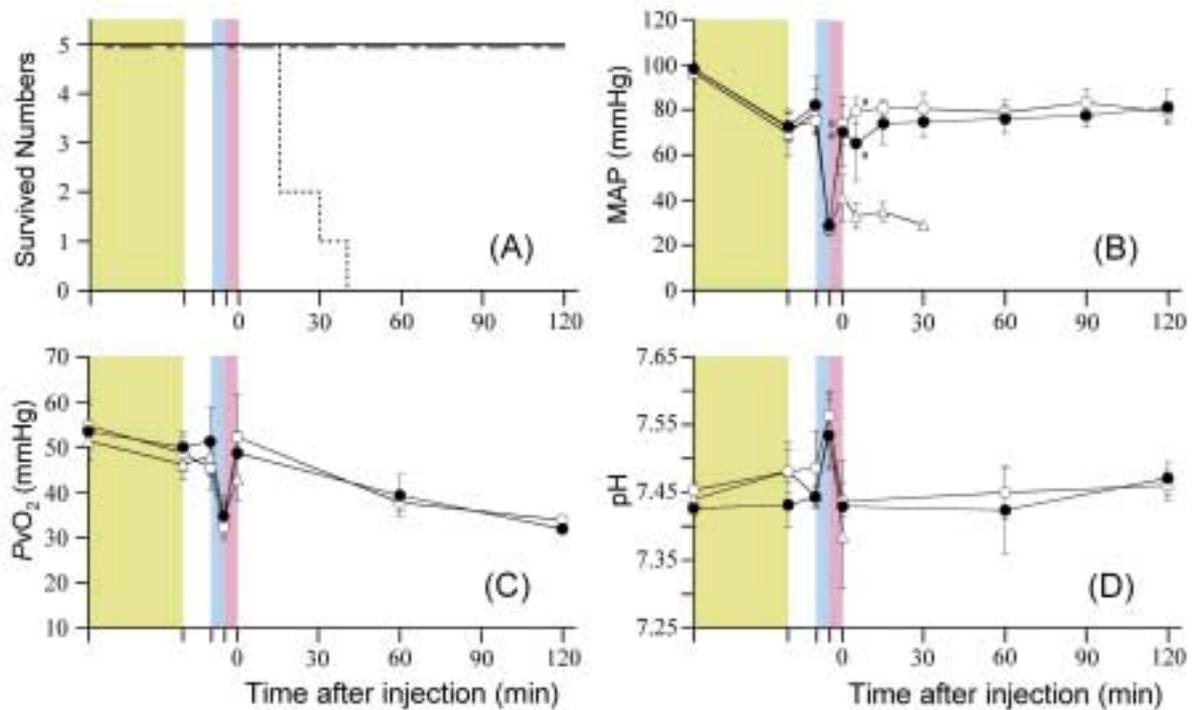


Fig. 6. Effect of PEG_{M2.4}(HSA-Fe4P) solution in anesthetized rats subjected to hemodilution and hemorrhage: (A) the changes of their survived numbers, (B) MAP, (C) PvO₂, and (D) pH. In (A) solid line; PEG_{M2.4}(HSA-Fe4P) group, broken and dotted line; RBC group, and dotted line; HSA group. In (B)(C)(D) each value represents the mean \pm S.D. of 5 rats [; PEG_{M2.4}(HSA-Fe4P) group, ; RBC group, and ; HSA group] The yellow, blue, and pink areas indicate the periods of 65% hemodilution, 30% bleeding, and sample infusion, respectively. * $p < 0.05$ versus HSA group (Tukey-Kramer test)

着した。再び水に溶解しスペクトル測定を行うと、薄膜にする前と同じように酸素結合が繰り返し観測された。PEG修飾HSA-FeXPはフィルムとして保存・携帯のできる人工酸素運搬体となる。

尚、本稿で紹介しきれなかった内容の詳細については、参考文献に詳しいのでそちらを参照頂ければ幸いです。

謝辞

本研究は、ニプロ(株)および厚労省科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)の支援により行われた。記して謝意を表す。

参考文献

- (a) Harris JM, Ed. (1992) Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum Press, New York; (b) Veronese FM, Harris JM. Introduction and overview of peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:453 - 456; (c) Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv Rev* 2002;54:459 - 476.
- Veronese FM. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* 2001;22:405 - 417.
- Nucci ML, Shorr R, Abuchowski A. The therapeutic value

of poly(ethylene glycol) modified proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 1991;6:133 - 151.

- Kawahara NY, Ohno H. Induced thermostability of poly(ethylene oxide)-modified hemoglobin in glycols. *Bioconjugate Chem* 1997;8:643 - 648.
- Yabuki A, Yamaji K, Ohki H, Iwashita Y. Characterization of a pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate as a physiologic oxygen carrier. *Transfusion* 1990;30:516 - 520.
- Talarico TL, Guise KJ, Stacey CJ. Chemical characterization of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate. *Biochim Biophys Acta* 2000;1476:53 - 65.
- Vandegriff KM, Malavalli A, Wooldbridge J, Lohman J, Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509 - 516.
- Manjula BM, Tsai A, Upadhy R, Perumalsamy K, Smith PK, Malavalli A, Vandegriff K, Winslow RM, Intaglietta M, Prabhakaran M, Friedman JM, Acharya AS. Site-specific PEGylation of hemoglobin at Cys-93(): correlation between the colligative properties of the PEGylated protein and the length of the conjugated PEG chain. *Bioconjugate Chem* 2003;14:464 - 472.

9. Peters T. (1996) All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press, San Diego.
10. (a) Komatsu T, Hamamatsu K, Wu J, Tsuchida E. Physicochemical properties and O₂-coordination structure of human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) derivatives. *Bioconjugate Chem* 1999;10:82 - 86; (b) Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Hamamatsu K, Wu J. Human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) derivative as a totally synthetic O₂-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* 1999;10:797-802; (c) Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Kinetics of CO and O₂ binding to human serum albumin-heme hybrid. *Bioconjugate Chem* 2000;11:772 - 776; (d) Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Effect of heme structure on O₂-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: Intramolecular histidine coordination provides a stable O₂-adduct complex. *Bioconjugate Chem* 2002;13:397 - 402; (e) Nakagawa A, Komatsu T, Iizuka M, Tsuchida E. Human serum albumin hybrid incorporating tailed porphyrinatoiron(II) in *trans*, *cis*, *trans*-conformer as an O₂ binding site. *Bioconjugate Chem* 2006;17:146 - 151.
11. (a) Komatsu T, Huang Y, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein "albumin-heme" into an acute anemia rat model after seventy-percent hemodilution. *J Biomed Mater Res* 2004;71A:644 - 651; (b) Huang Y, Komatsu T, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Exchange transfusion with entirely synthetic red-cell substitute albumin-heme into rats: physiological responses and blood biochemical tests. *J Biomed Mater Res* 2004;71A:63 - 69.
12. Adams PA, Berman MC. Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric heme. *Biochem J* 1980;191:95 - 102.
13. Russo SM, Pepe JA, Donohue S, Cable EE, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Tissue distribution of zinc-mesoporphyrin in rats: relationship to inhibition of heme oxygenase. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 1995;272:766 - 774.
14. Huang Y, Komatsu T, Wang R-M, Nakagawa A, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)conjugated human serum albumin including iron porphyrins: surface modification improves the O₂-transporting ability. *Bioconjugate Chem* 2006;17:393 - 398.
15. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971;31:87 - 96.
16. Pedersen AO, Jacobsen J. Reactivity of the thiol group in human and bovine albumin at pH 3-9, as measured by exchange with 2,2'-dithiodipyridine. *Eur J Biochem* 1980;106:291 - 295.
17. Vandegriff KD, McCarthy M, Rohlfis R, Winslow RM. Colloid osmotic properties of modified hemoglobins: chemically cross-linked versus polyethylene glycol surface-conjugated. *Biophys J* 1997;69:23 - 30.
18. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M. Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skinfold model. *Am J Physiol* 1998;275:H2170 - 80.
19. Tsuchida E, Komatsu T, Kumamoto S, Ando K, Nishide H. Synthesis and O₂-Binding properties of tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivatives bearing a proximal imidazole covalently bound at the *pro*-pyrrolic position. *J Chem Soc Perkin Trans2* 1995;1995:747 - 753.
20. Komatsu T, Ohmichi N, Nakagawa A, Zunszain PA, Curry S, Tsuchida E. O₂ and CO binding properties of artificial hemoproteins formed by complexing iron protoporphyrin IX with human serum albumin mutants. *J Am Chem Soc* 2005;127:15933 - 15942.
21. Sugawara Y, Shikama K. Autoxidation of native oxymyoglobin. *Eur J Biochem* 1980;110:241 - 246.
22. Tsuchida E, Komatsu T, Hamamatsu K, Matsukawa Y, Tajima A, Yoshizu A, Izumi Y, Kobayashi K. Exchange transfusion of albumin-heme as an artificial O₂-infusion into anesthetized rats: physiological responses, O₂-delivery and reduction of the oxidized heme sites by red blood cells. *Bioconjugate Chem* 2000;11:46 - 50.
23. Huang Y, Komatsu T, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. PEGylated albumin-heme as an oxygen-carrying plasma expander: exchange transfusion into acute anemia rat model. *Biomaterials* 2006;27:4477 - 4483.

血管炎治療のための人工ガンマグロブリンの開発に関する研究 Immunomodulatory Therapy for Vasculitis with a Synthetic IVIg

鈴木和男
Kazuo Suzuki

要旨

免疫グロブリン製剤は、重症感染症、川崎病や一部の難治性疾患などの治療に使用されている。また、「人工ガンマグロブリン開発」プロジェクトでは、欧米よりわが国に多い難治性疾患に分類されるMPO(myeloperoxidase)ANCA (specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody) 関連血管炎において、大量ガンマグロブリン製剤 (IVIg) 治療法により、早期の疾患活動性の抑制、腎死や感染症発症頻度の低下などの有効な成績を報告した。これを基礎に、現在、免疫グロブリン製剤によるIVIg治療の血管炎への探索試験も開始されている。免疫グロブリン製剤は、その用途拡大が見込まれ、需要が増える傾向にある。しかし、その原材料供給、感染症リスク、医療経済の点からガンマグロブリンの人工化が今日の急務となっている。これらを克服するため、「人工ガンマグロブリン開発」プロジェクトでは、その人工化をめざした。まず、評価法として血管炎モデルマウスを確立するとともに、マウス型人工ガンマグロブリンの合成に成功し、マウス型人工グロブリンによる血管炎モデルマウスの治癒効果を認めた。モデルマウスに有効なマウス型人工ガンマグロブリンが合成できたことで、ヒト型人工ガンマグロブリンの製剤化への準備とその臨床応用の準備はほぼ整いつつある状況になった。

Abstract

High dose intravenous immunoglobulin(IVIg) treatment has been performed as a standard therapy for Kawasaki disease. On the other hand, for other vasculitis rapid progressive glomerulonephritis(RPGN) classified to MPO-ANCA associated vasculitis, IVIg treatment improves the outcome of this highly life-threatening disease in Europe and Japan. In addition to any therapeutic trials for have been performed. One of potential mechanisms may be the suppression of the presentation of MPO to stimulated neutrophils, although there are many potential mechanisms underlying the beneficial effect of IVIg. The favorable outcome of the IVIg for MPO-ANCA related RPGN in Japan and the partial elucidation of the mechanism of action has been reported(Ito-Ihara et al., Nephron Clin Pract. 102:c35-c42, 2005) and randomized clinical trial for the disease is in progress. For safety, we have to develop a synthetic IgG for the therapy using a novel techniques. In this paper, strategies of a synthetic IgG for clinical treatment is described.

Keywords

Immunoglobulin, Vasculitis, IVIg, Synthetic IgG, ANCA, myeloperoxidase(MPO)

はじめに

免疫グロブリン製剤は、重症感染症をはじめ、加齢によって増加する自己免疫疾患、血管炎、リウマチなどの難治性疾患への初期治療として必要性が増していることは、高度高齢社会に入ったわが国における特徴でもある。特に、難病の治療には、その大量療法 (IVIg) が有効である。また、高齢者にとってステロイドパルス治療は、危険性が高く、IVIg治療への関心が高まっている。このようにその用途拡大が見込まれることもあって、需要が微増ながら増え続けている (Fig. 1).

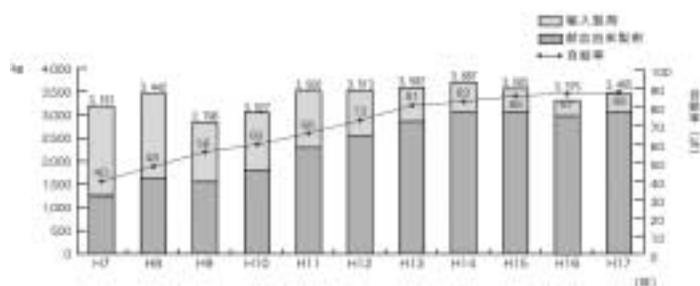


Fig. 1. 静注用免疫グロブリン製剤の製造・輸入量の推移。
(血液製剤調査機構ホームページより)

しかし、その適応・用途を拡大したくとも、供給源の確保の問題、感染症リスクなどの安全性確保や高額治療のため、その使途が限界状態にきている。また、医療サイドから、その利用が望まれている治療法との矛盾や問題を解決するには、人工化によって供給を増加させることが必須の状況でもある。

IVIgが有効であった難治性血管炎について、以下に述べる。近年、好中球抗体が血管炎の発症に関与しており、Microscopic polyangiitis (MPA)などの血管炎の顕微鏡所見から好中球浸潤が認められることがあるなど、病態に好中球が関与していることが観察されている。血管炎の病因にかかわる液性のリスク因子には、好中球自己抗体ANCAをはじめ、自己抗体や、TNF、IL-1、インターフェロン、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70などの炎症性サイトカインがあり、また、接着分子、内膜・中膜・外膜あるいは細胞外マトリックスの反応系などもリスク因子である。これらの因子がトリガーとなって、好中球を活性化したり、血管内皮細胞を活性化したり、apoptosisを誘導して、血管炎の進展に連鎖していると推定されている。一方、血管炎の患者では、好中球顆粒酵素のMPO(myeloperoxidase)が放出されやすい活性化された好中球が、高いMPO活性とともに血液中を循環していることが明らかになっている。その活性化好中球が、血管炎の発症と病態の進行に深く関与していると推定されている。この時、好中球は、FabやFcレセプターを介して活性化されていることが示されている。自己抗体MPO(myeloperoxidase)ANCA(specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody)抗体のFabやFcレセプターが関与して好中球を活性化しているとの報告もある¹⁾。この様にして、生体側に不利な細胞傷害を引き起こす好中球の活性化に、サイトカイン、接着分子、ANCAなどが深く関わっていることが明らかにされてきており、その過剰反応を押さえることが治療に結びつくと考えられている。MPO-ANCAとPR-3(preteinase-3)ANCAの対応抗原はMPOおよびPR-3の好中球顆粒成分である。特に、MPOは、H₂O₂を基質として細胞傷害を示す酵素である²⁾。血清中のMPO-ANCA陽性の対象疾患として、川崎病や腎炎などの血管炎が主であるが、慢性関節リウマチやSLEにおいてもMPO-ANCAが高値を示すケースがある。MPOは、MPO-ANCAの抗原として作動する³⁾。われわれのMPO欠損マウスを用いた実験において、MPO-ANCAの激減と冠状動脈炎の発症が抑制されたことから、MPOが抗原となりMPO-ANCAが産生され、これに呼応して血管炎が発症することが裏付けられた³⁾。

しかし、血管炎の治療や、病因を解析するには、患者の血液検査だけでは限界があり、血管炎のモデルマウスを用いた研究が必須である。腎炎や血管炎を自然発症するマウスには、NZB/WF1、MRL/lpr、SCG/Kjがある。また、*Candida albicans*由来分子のCADS(*Candida albicans* derived substances)やCAWS(*Candida albicans* water-soluble substances)によって誘導される冠状動脈血管炎マウスが開発されている^{4,5)}。

CADS誘発の冠状動脈炎マウス^{4,5)}は、血管炎発症とともに、血中にMPO-ANCAが上昇する³⁾。この冠状動脈血管炎マウス

において、冠状動脈血管炎発症率とMPO-ANCA値に、正の相関が認められたことから、CADS抽出物誘発の冠状動脈血管炎の発症に、MPO-ANCA産生の関与が示唆された。冠状動脈血管炎発症へのMPOの関与を解析するため、MPO-KOマウスに冠状動脈血管炎を誘導させた。MPO-KOマウスにおいて、CADS誘発の血管炎発症率と血清中のMPO-ANCA値を測定し、野生型(C57BL/6)のそれと比較した。その結果、野生型マウスに比べてMPO-KO群の血管炎の発生率は40%となり、対照群の100%より激減した。一方、血清中のMPO-ANCA値は、MPO-KOマウスでは、野生型マウスに比べ、ほぼPBS投与に匹敵するほど低下していた³⁾。

以上のように血管炎は、好中球をはじめ炎症細胞の活性化や種々のサイトカインレベルの上昇と連動しており、それらの過剰反応の抑制をすることが必要である。そこで、筆者らは「人工ガンマグロブリン開発」プロジェクトにおいて、川崎病とMPO-ANCA関連血管炎の治療を目的とし、MPO-KOマウスにMPOを投与し、その脾臓細胞のmRNAのライブラリーから人工Fv抗体を作製する系を構築した。まず、人工IVIg治療用のプロトタイプとしてマウス型を完成させ、次いで、ヒト免疫グロブリン製剤としてヒト型人工ガンマグロブリンを開発することを目標にし、同時並行して、二つの血管炎モデルマウス(3種類)を開発し治療実験を行った。以下のプランが進行中である。

1) モデルマウスの治療実験に必要な大量のマウス型人工ガンマグロブリンを得る。

2) 人工ガンマグロブリンは、すでに作製したライブラリーにFcを加えて人工グロブリン製剤として完成させる。

3) 臨床での免疫グロブリンの有効性を検討。

すでに治療法として定着している川崎病と同じプロトコルを血管炎・腎炎に応用し、IVIg治療による臨床好成績を得て国際誌に発表し、それをもとに、現在探索試験が開始されている。

4) 基礎班と臨床側とのタイトな共同研究の構築

人工ガンマグロブリン開発とその応用に向けた安全性の向上について、臨床サイドから基礎班が進める人工グロブリン開発のための動物実験治療のバックアップも行っている。

1. 人工ガンマグロブリンの作製と疾患モデルマウスへの治療効果

(1) マウス型人工化グロブリンのポリクローナル抗体作製

MPOで免疫されたMPO-KOマウスの脾臓RNAよりマウスFv領域増幅プライマーを用いるPCRによってVHおよびVL遺伝子を増幅し、VHおよびVL遺伝子よりオーバーラップPCRによって遺伝子を合成した。また、Fc、CHなど、必要な領域も作製できた。完全長とIgGフラグメントの精製法も確立し、マウスの治療用の大量精製法も、ほぼ完成し、問題であった可溶性技術もクリアした。

1) ポリクローナルFv領域の作製

、 μ 、および鎖の定常領域に特異的なプライマーによって抗体cDNAを合成し、cDNAを鋳型として、マウスFv領域

増幅プライマーを用いるPCRによってVHおよびVL遺伝子を増幅した。また得られたVHおよびVL遺伝子よりオーバーラップPCRによって遺伝子を合成した。形質転換された大腸菌で大量培養(37℃)し、ポリクローナル抗体を回収した。封入体を3M尿素で十分に洗浄した後、8M尿素で溶解した。

2) 重鎖定常領域の作製

大腸菌抽出液より、FcはProtein Aカラムにより吸着させ、0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH3.0)で溶出した。溶出された融合蛋白質を50mMトリスリン酸緩衝液(pH7.0)へ透析した。透析内液にPreScission proteaseを作用させ、遊離させた。プロテアーゼ消化物をpH8.9下でTSLgel SuperQ-5PWカラムにより分離した(Fig. 2)。

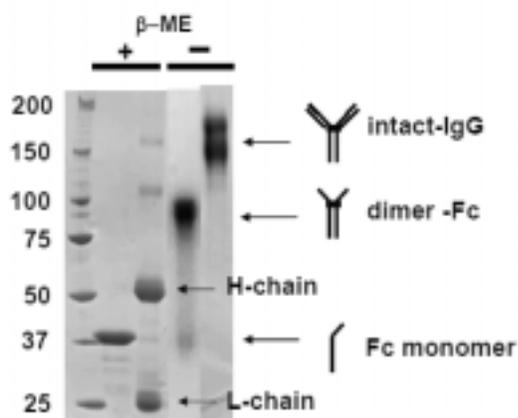


Fig. 2. マウス型IgGのSDS-PAGE

(2) モデル動物によるガンマグロブリンの治療効果

1) 血管炎モデルマウス

川崎病様血管炎誘導モデルマウス

IVIgの臨床応用にむけ、治療評価のために病態モデルマウスとしてCAWS誘導冠状動脈炎モデルマウスを開発した。

これまで、*Candida albicans* IFO 1385を完全合成培地で培養し、その培養上清中から得られるCAWSをマウスに腹腔内投与して川崎病類似の血管炎を発症させた。

RPGN(Rapid progressive glomerulonephritis)モデルマウス

SCG/KjマウスおよびBovine serum albumin(BSA)誘導マウスの病態を評価した。SCG/Kjマウスは、IVIg治療モデルとして有用であることを明らかにした⁷⁾。また、BSA誘導腎炎マウスの評価も終了し、IVIgの治療モデルとして有用性が高いということが示された⁸⁾。SCG/Kjマウスは、RPGNの疾患モデルであり、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する。本マウスは、末梢血中に活性化好中球数が増加し、炎症を拡大し、腎臓への活性化好中球浸潤が半月体形成に重大な影響を及ぼしている。本研究において、SCG/Kjマウスの解析からMPO-ANCAの責任遺伝子座(Man-1およびMan-2と命名)を明らかにした⁹⁾。

2) 天然型ヒト免疫グロブリン製剤による治療

C57BL/6Nマウスに対し、PBSに懸濁したCAWS 4mgを連続5日間腹腔内接種した。CAWS接種後にヒト免疫グロブリン製剤(h-Ig)を尾静脈から持続点滴した。h-Ig投与量は川崎病治療に準じ、400mg/Kg x 5日間連続投与と2000mg/Kg x 1回投与を設定した。実験28日目に炭酸ガス下に安楽死させ、直ちに剖検した。冠状動脈分岐部を含む心基部大動脈水平断のステップ標本作製し、血管炎の詳細について観察した。

対照における汎血管炎の発生頻度は86%であった。免疫グロブリン製剤(h-Ig)の400mg x 5日間連続投与ではh-Ig群、high MPO-ANCA(含MPO抗体)群、low MPO-ANCA(不含MPO抗体)群すべて汎血管炎発生頻度は減少した。

3) マウス型人工ガンマグロブリン(SyIG)治療

SyIGをCAWS接種後に尾静脈から持続点滴した。汎血管炎発生頻度はSyIG投与群と対照群との間で有意差を認めなかったが、汎血管炎の広がり定量化し、心基部を無・左・右冠尖および左・右冠動脈の5つの区域に分け、侵襲されている領域について検討した。その結果、対照群では検索した全区域の44%の領域で汎血管炎が発生していたのに対し、Fv-SyIG 4mg/ml, 2mg/ml投与群で侵襲区域は有意に減少し、病変範囲は限局化した。

2. IVIg療法の臨床的検討

(1) RPGNにおけるIVIg治療

IVIgが有効な治療として評価されている血管炎に川崎病がある。本疾患のIVIgの治療評価も検討した。また、自己免疫性の血管炎であるMPO-ANCA関連血管炎を呈する腎炎(RPGN)の治療法に川崎病のIVIg治療のプロトコルの適応を検討した。人工ガンマグロブリンの治療検討の前段階として、まず、RPGNにおけるIVIgを施行し、国際誌に報告し¹⁰⁾、高い評価を受けた(Table 1, 2, Fig. 3)

ヒト免疫グロブリン製剤は、重症感染症をはじめ、加齢によって増加する自己免疫疾患、血管炎、リウマチなどの難治性疾患への初期治療として必要性が増している。特に、近年増加の一途をたどっている高齢者に後発するMPO-ANCA陽性全身血管炎に関連して発症するANCA関連急速進行性糸球体腎炎には、従来の標準的免疫抑制治療では、しばしば重篤な感染症や薬剤の副作用をもたらす、その治療に難渋していたが、これらに対し導入期にIVIg療法を行うことで、予後の改善が得られることが、この研究班を中心とした臨床的検討で明らかとなり、その成果を公表した。同時のその免疫学的作用機序の解明に向けて、本研究班の臨床部会で、IVIg治療による患者の末梢血中のサイトカイン動向や、好中球、リンパ球機能の解析をすすめ、疾患活動性および、治療反応性の指標を確立しつつある。また、これらの成果をうけて、当該プロジェクトのメンバーが中心となって、我が国の数カ所の施設を拠点としてさらに治療症例が蓄積され、予後の改善が証明された。一方、客観的な治療効果のエビデンスを確立するため、全国19施設において前期第II相

Table 1. Characteristics of the 12 patients (M/F=7/5)

Patient	Age	Sex	Data before treatment								
			WBC/ μ l	CRP mg/l	Cre μ mol/l	MPO-ANCA, EU	Active crescents, %	BVAS	extrarenal manifestations	pulmonary involvement	latent and antibiotics resistant infections
1	82	F	7,000	80	283	239	81	19	S, F, E		HBV carrier
2	75	M	9,600	178	106	435	0	23	S, F, A, C, N		MAC, <i>K. pneumoniae</i>
3	61	F	8,100	43	126	244	71	15	S, F		
4	82	M	9,400	104	417	159	71	14	S, A		
5	64	F	12,100	154	737	276	81	19	S, F, L	infiltrate	
6	59	M	10,200	139	389	140	90	15	S, F		<i>Aspergillus</i>
7	83	F	4,700	1	258	617	60	20	S, F, Ab		
8	82	F	14,700	113	210	306	38	21	S, F, N		
9	57	M	10,700	99	357	980	64	19	S, A, N		
10	62	M	10,100	101	732	370	80	25	S, L, N	nodules	
11	75	M	9,300	60	1,012	82	33	27	S, E, L	infiltrate	HBV carrier, MRSA, <i>P. aeruginosa</i>
12	67	M	11,900	68	401	1,740	78	19	S, L	hemoptysis	MRSA
Mean	71		9,820	95	419	466	62	20			
Reference range			3,500–9,100	<3	<106	<20		0			

WBC = White blood cell count; CRP = C-reactive protein; Cre = serum creatinine; MPO-ANCA = myeloperoxidase antineutrophil antibody; BVAS = Birmingham Vasculitis Activity Score; S = systemic symptom (malaise, myalgia, weight loss); F = fever; A = arthralgia; C = cutaneous; E = ear-nose-throat; L = lung; Ab = abdomen; K = kidney; N = neuropathy; HBV = hepatitis B virus; MAC = *Mycobacterium avium* complex; *K. pneumoniae* = *Klebsiella pneumoniae*; MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*.

Table 2. Treatment and outcomes after IVIg treatment

Patient	Initial immunosuppressive treatment just after IVIg				Treatment after 3 months			
	mPSL pulse	PSL dosage mg/kg/day	CYC dosage mg/kg/day	dialysis	PSL dosage mg/kg/day	CYC dosage mg/kg/day	dialysis	Cre μ mol/l
1	-	0.3	0.7	-	0.3	0	-	124
2	-	0.7	0.4	-	0.3	0.4	-	88
3	-	1.0	1.0	-	0.5	1.1	-	92
4	-	0.5	-	HD	0.7	-	- ¹	308
5	-	1.0	1.0	-	0.6	1.1	-	204
6	1 g, 3 days	0.7	0.8	-	0.3	0	-	177
7	-	0.5	1.3	-	0.3	0	-	203
8	-	0.6	-	-	0.4	-	-	87
9	1 g, 3 days	0.7	0.7	-	0.2	1.7	-	141
10	-	0.8	0.8	-	0.4	0.8	-	353
11	-	0	-	HD	0.5	-	HD	723 ²
12	0.5 g, 3 days	0.5	-	-	0.5	-	-	131
Mean		0.6	0.8 ³		0.4	0.6 ³		173 ⁴

mPSL pulse = Methylprednisolone pulse therapy; PSL = prednisolone; CYC = cyclophosphamide; Cre = serum creatinine; HD = hemodialysis.

¹ Cessation of HD; ² Cre level before a hemodialysis; ³ mean CYC dose of 8 patients; ⁴ patient 11 was excluded.

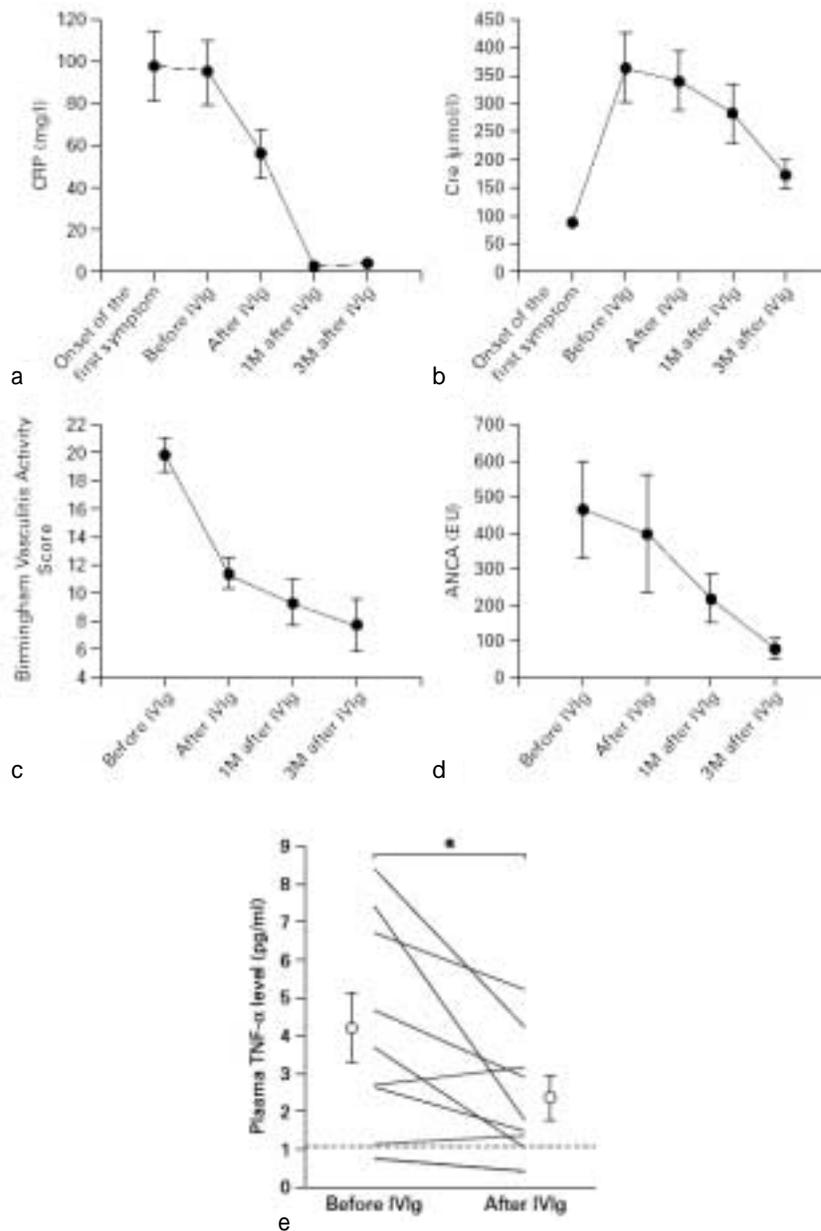


Fig. 3. IVIg治療による検査項目および評価項目の改善
 a: CRP, b: クレアチニン, c: BVASスコア, d: ANCA値, e: 血漿中TNF-

の多施設共同研究が進行中である。これら臨床的なIVIgの効果の証拠とその効果判定法の確立により、人工グロブリン完成後のtranslational researchおよびその実用化への展望がひらけ、難治性血管炎をふくむ重篤な全身免疫疾患への安全で確実な治療法開発に確実に近づいた。この臨床試験は、人工化の大前提であり、現在人工化IVIgの治療法へ向けて準備が着々と進んでいる。

(2) IVIg治療の評価

1) RPGNにおけるIVIg治療評価

MPO-ANCA関連急速進行性糸球体腎炎に対する標準的治療の導入期にIVIg療法を行うことで、予後の改善が得られるこ

とを報告してきた。その効果発現機序には、流血中の自己抗体の中和作用、好中球の活性化の抑制による活性酸素発生の抑制、モノサイト(Mo)のFc R修飾によるサイトカイン産生への影響、NK細胞機能への影響、抗体産生の抑制、補体活性の抑制など様々な作用機序が考えられている。これらの効果の評価法の探索として、Th1誘導性サイトカインであるIL-12をはじめとして、様々な炎症性サイトカインの変動を検討してきた。また、活性化した好中球の指標であるMPO発現について、微細蛍光発色分子であるカンタムドットを結合させた抗MPO抗体を用いた検出法により評価が可能となった。これを用いてIVIgによる活性化好中球の抑制が観察され今後の病変活動性の変動を検討する手段の確立がなされつつある。

2) 川崎病のIVIg治療評価

リン脂質の過酸化が酸化ストレス(OS)によるものであることが明らかになり、多くの心血管障害と密接に関連していることが報告されている。そのOSの原因物質としてreactive oxygen species(ROS)が報告され、ROSには、superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radicalが含まれ、再灌流傷害、糖尿病、低酸素血症で上昇する。血液中で安定したROSを測定した。川崎病患者にIVIg投与前と投与3日後、投与7日後では有意に低下していた。ROSは心筋傷害のパラメータであるBNPと有意に関連していた。

3. モデルマウスの誘導に関する基礎的検討および評価法

(1) CAWSの致死活性ならびに血管炎惹起活性発現に関わる構造上の特徴

CAWSはmannoprotein-glucan complexであって、活性に関わると思われる種々の部分構造を含有している。活性中心を検索することは血管炎惹起を分子レベルで解析するために必須の情報である。Candidaのマンナン抗原の構造は培養条件によって左右されることが知られている。そこで、Candidaを27と37, pH2, 5, 7と種々の条件で培養し、それらの条件でCAWSを作成した。その中で、27 pH5ならびに27 pH7で作成したCAWSは急性致死活性ならびに血管炎惹起活性の何れも著しく弱かった。マンナン構造についてNMRならびに特異抗体で検討したところ、上記に制御した条件では1, 2-結合が著しく増加することが明らかとなった。これらのことから、CAWS血管炎にはマンナン構造が重要であり、マンナン構造は抑制的に作用する可能性のあることが示唆された¹²⁾。

(2) CAWS誘導血管炎の初期反応の解析

CAWS腹腔投与直後から、末梢好中球は増加した。その原因は好中球が骨髄から末梢へ移動したことによると考えられる。また、好中球機能について解析したところ、MPO放出、活性酸素産生能いずれもCAWS投与1時間後から活性化する傾向を認めた。さらに、炎症性サイトカイン産生について解析したところ、CAWS投与後早期においてIL-12/p70, IL-1, IL-10, IL-6の炎症性サイトカイン産生を認めた。また、MIP-2, G-CSFの産生を認めた。CAWS投与によって産生が有意に増加したIL-1, IL-6, IL-10を好中球が産生する可能性を明らかにするため、CAWS 1 mg/mlを腹腔滲出好中球に作用させたところ、IL-6の産生はCAWSによって亢進したがIL-1, IL-10はCAWSの存在とは無関係に好中球が産生していることが示された。心大動脈局所の内皮の傷害性についてICAM-1発現を指標にして検討をしたところ、CAWS投与16時間後には有意な上昇を認めた。また、血中の可溶性ICAM-1もCAWS投与後、時間の経過とともに上昇した。一方、好中球活性化の原因のひとつとして補体の活性化について検討したが、CAWS投与直後からその活性化が認められた¹³⁾。

4. まとめと考察

プロジェクトで作製してきたマウス型人工グロブリンは、血管炎モデルマウスに有効であり、ヒト型による治療法に向けた準備が整った。

(1) マウス型人工IVIgによるモデルマウス治療の成果

本研究で推進した人工ガンマグロブリンは、まずマウス型の合成に成功し、血管炎モデルマウス(川崎病, RPGN)への有効性を示すことができた。

(2) ヒトIVIg血管炎治療の成績

免疫グロブリン製剤は、重症感染症をはじめ、加齢によって増加する自己免疫疾患、血管炎、リウマチなどの難治性疾患への初期治療として必要性が増し、ヒト免疫グロブリン製剤の使用が微増ながら増え続けている。特に近年増加の一途をたどっている高齢者に高発するMPO-ANCA陽性全身血管炎に発症する急速進行性糸球体腎炎には、従来の標準的免疫抑制治療では、しばしば重篤な感染症や薬剤の副作用をもたらし、その治療に難渋していたが、これらに対し導入期にIVIg療法を行うことで、予後の改善が得られることをこの研究班を中心とした臨床的検討で明らかにした。臨床的なIVIgの効果の証拠とその効果判定法の確立により、人工ガンマグロブリン完成後のtranslational researchおよびその実用化への展望がひらけ、難治性血管炎をふくむ重篤な全身免疫疾患への安全で確実な治療法開発に確実に近づいた。この臨床試験は、人工化の大前提であり、現在人工化IVIgの治療法へ向けて準備が着々と進んでいる。また、日経産業新聞への掲載などもあり、一般の関心が高まっている。

(3) 作用点

MPO-ANCAの病態エピトープ解析から、MPO-ANCAのモノクローナル抗体が血管炎の進行と関わることがわかった。また、MPO-ANCAは、活性化した好中球の表面にでてくるMPOをFabにより認識し⁴⁾、Fcレセプター欠損マウスでは、腎炎が発症しないことから、好中球の活性化に関与する抗体および免疫複合体は特異性が高いモノクローナル抗体であることが明らかになってきている。一方、川崎病の治療に用いられている免疫グロブリン製剤は、MPO-ANCAを含んでいるが、ポリクローナルであることを確認している。健康者血中にもMPO-ANCAが含まれているのと同様である。これらのことから、病因性の高いモノクローナル抗体が、ポリクローナル抗体によって弱められていることが治療に有効性を示す一因である可能性もある。MPO-ANCAのクロナリティーは、血管炎疾患および病態と関連があることを示唆している¹¹⁾。このエピトープ指標を使った病態評価法は、治療法の導入に際し、利用できる可能性が示されている。大量免疫グロブリン治療の好成績は、この状態を反映している可能性もある。

(4) 人工ガンマグロブリンの製剤化をめざす

この間の研究において、血管炎治療用をめざしたマウス型人工ガンマグロブリン合成が可能となり、IVIg治療法のEBMの観点から、モデルマウスで治療を実施し、その有意な有効性を認め、マウス型人工ガンマグロブリンの開発はほぼ完了した。

今後も、臨床および基礎班での共同研究を通じて、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済に応えるようにしたい。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と安全性向上に関する研究」プロジェクトの共同研究者によって行われた研究成果を整理したものである。本プロジェクトの分担者、協力者、アドバイザーの先生方に感謝します。

文献

1. Wakayama H, Hasegawa Y, Kawabe T. Abolition of anti-glomerular basement membrane antibody-mediated glomerulonephritis in FcRgamma-deficient mice. *Eur J Immunol* 30 2000; 1182-1190.
2. Aratani Y, Koyama M, Nyui S, Suzuki K, Kura F, Maeda N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infection and Immunity* 67 1999; 1828-1836.
3. Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Hashimoto H, Aratani Y, Koyama H, Maeda N, Naoe S, Suzuki K. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25 2001; 381-387.
4. Murata H. Experimental candida-induced arteritis in mice: Relation to arteritis in the mucocutaneous lymph node syndrome. *Microbiol. Immunol.* 23 1979; 825-831.
5. Takahashi K, Oharaseki T, Wakayama M, Yokouchi Y, Naoe S, Murata H. Histopathological features of murine systemic vasculitis caused by *Candida albicans* extract - an animal model of Kawasaki Disease. *Inflamm. Res.* 53 2004; 72-77.
6. Nagai-Miura N, Shingo Y, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, and Ohno N. Induction of coronary arteritis with administration of CAWS(*Candida albicans* water-soluble fraction) depending on mouse strains. *immunopharmacol. immunotoxicol.* 26 2004; 527-543.
7. Ishida-Okawara A, Ito-Ihara T, Muso E, Ono T, Saiga K, Nemoto K, Suzuki K. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19 2004; 1708-1715.
8. Yumura W, Itabashi M, Ishida-Okawara A, Tomizawa K, Yamashita J, Kaneshiro Y, Nihei H, and Suzuki K. A Novel mouse model for MPO-ANCA-associated glomerulonephritis. *Microbiol.Immunol.* 50 2006; 149-157.
9. Hamano Y, Tsukamoto K, Abe M, Sun M.D, Zhang D, Fujii H, Matsuoka S, Tanaka M, Ishida-Okawara A, Tachikawa H, Nishimura H, Tokunaka K, Hino O, Hirose S, and Suzuki K. Genetic dissection of vasculitis, myeloperoxidase-specific antineutrophil cytoplasmic antibody production, and related traits in spontaneous crescentic glomerulonephritis-forming/kinjoh mice. *J. Immuno* 2006; in press.
10. Ito-Ihara T, Ono T, Nogaki F, Suyama K, Tanaka M, Yonemoto S, Fukatsu A, Kita T, Suzuki K, and Muso E. Clinical efficacy of intravenous immunoglobulin for patients with MPO-ANCA-associated rapidly progressive glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract.* 102 2005;c35-c42.
11. Fujii A, Tomizawa K, Arimura Y, Nagasawa T, Ohashi YY, Hiyama T, Mizuno S, Suzuki K. Epitope analysis of myeloperoxidase(MPO)specific anti-neutrophil Cytoplasmic autoantibodies(ANCA)in MPO-ANCA- associated glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 53 2000;242-52.
12. Shinohara H, Nagai-Miura N, Ishibashi K, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, and Ohno N. Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans*. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; in press.
13. Ishida-Okawara A, Nagi-Miura N, Oharaseki T, Takahashi K, Okumura A, Tachikawa H, Kashiwamura S, Okamura H, Ohno N, Okada H, P. A. Ward, Suzuki K. Neutrophil activation and induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein- -glucan complex(CAWS) *Exp. Mol. Pathol.* 2006; in press.

ヘモグロビン小胞体を用いた人工心肺充填液による高次脳機能保護効果 - ラット人工心肺モデルによる検討 -

Use of Hemoglobin Vesicles during Cardiopulmonary Bypass Priming Prevents Neurocognitive Decline in Rats

山崎真敬, 饗庭 了, 四津良平, 小林紘一

Masataka Yamazaki MD*, Ryo Aeba MD*, Ryohei Yozu MD*, and Koichi Kobayashi MD†.

研究要旨

新生児や乳児の開心術の成績は近年飛躍的に向上しているが、一般的には人工心肺回路の充填液として輸血が必須である。これは低体重の患者において無輸血充填を行った場合、高度の血液希釈が生じ、特に酸素需要の大きな脳の不可逆的障害を来す可能性が高いためである。一方で、輸血には感染症、移植片対宿主反応、免疫抑制、炎症性生体物質活性化による臓器障害といった合併症の危険を伴う。こうした臨床上のジレンマの一解決手段として、我々は早稲田大学理工学総合研究センター及び慶應義塾大学呼吸器外科にて共同研究が進められているヘモグロビン小胞体 (Hemoglobin vesicle, HbV) に着目した。本研究は、ラット人工心肺モデルを確立した後、人工心肺回路をHbVで充填した群において高次脳機能が維持されることを証明した。これはHbVの充填により末梢組織への酸素運搬が保持されたためと考えられ、HbVの有用性が明らかとなった。

A. 緒言

先天性心疾患を伴う体重10kg以下の乳児の開心術においては、同種血輸血による人工心肺回路充填が一般に行われている。その理由は、人工心肺回路の充填液は300mlから400ml必要であり、これを晶質液で満たした場合、体重10kg以下の患者（循環血液量は約800ml）では、高度な血液希釈が生じ、酸素運搬を担う赤血球の相対的な減少により組織障害、特に酸素需要の大きな脳の障害を来すためである。

このために、現在体重10kg以下の患者に体外循環を行う場合、赤血球輸血は避けられない状況にある。しかし一方で、輸血による感染症、移植片対宿主反応、免疫抑制といった合併症のリスクを伴い、社会的にも大きな問題となっている。また、炎症性生体物質の遊離を促進することによる脳障害の発生も指摘されており、できるだけ輸血を避けるように努めるべきである。

この臨床上のジレンマの解決手段として、我々は、人工酸素運搬体であるHbVに着目した¹⁻³⁾。現時点のHbVは半減期が約20から30時間と短い。しかしながら人工心肺運転中に生じる血液希釈状態という特殊な環境はおおよそ数時間であり、その数時間だけ血液の役割を果たし、その後速やかに代謝される現在のHbVは小児心臓外科の立場から考えると臨床上のジレンマを解決に導く大きな利点となる。すなわち、HbVの短い半減期を活用するという逆転的発想により本研究は成り立っている。

本研究は、ラット人工心肺モデルにおいてHbVを用いた人工心肺充填液による高次脳機能保護効果の検討を目的に行われた。

B. 方法

人工酸素運搬体は早稲田大学理工学総合研究センター及び慶應義塾大学呼吸器外科にて共同研究が進められているHbVを使用した⁴⁾。ローラーポンプと特製膜型肺を用いて人工心肺回路を作成し (Fig. 1.)⁵⁾、回路内に5%アルブミンを充填した群 (HbV(-)prime群 n=7)、HbVを充填した群 (HbV(+))prime群 n=7)、偽手術群 (sham surgery群 n=7) の3群に分けて実験を行った。体重450g前後のSDラットをセボフルレンにて全身麻酔し、14G静脈留置針にて気管内挿管した。挿管後人工呼吸器管理とした。人工心肺の確立に際して、脱血管は右内頸静脈を介して右房へ、送血管は尾動脈に挿入した。胸骨正中切開は行わなかった。右内頸静脈にアプローチする際、ラットの右頸部に切開を加えるが、皮切線はわずかで動物への負担を最小にするように配慮した。人工心肺の運転は常温下、無拍動送血法で200ml/kg/minの流量で90分間行った。回路内充填量は60mlとした。HbV充填液のヘモグロビン濃度は8.6g/mLとした (Fig. 2.)。

人工心肺運転終了後は人工心肺回路内の残存血液を遠心分離し、沈殿した自己血を20分間かけて血管内に戻した。その後、

慶應義塾大学外科 (心臓血管*および呼吸器外科) 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 Divisions of *Cardiovascular Surgery and †General thoracic Surgery, Keio University, Tokyo, Japan. Division of Cardiovascular Surgery, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo, 160-8582, Japan.

論文受付 2006年5月29日 論文受理 2006年7月14日

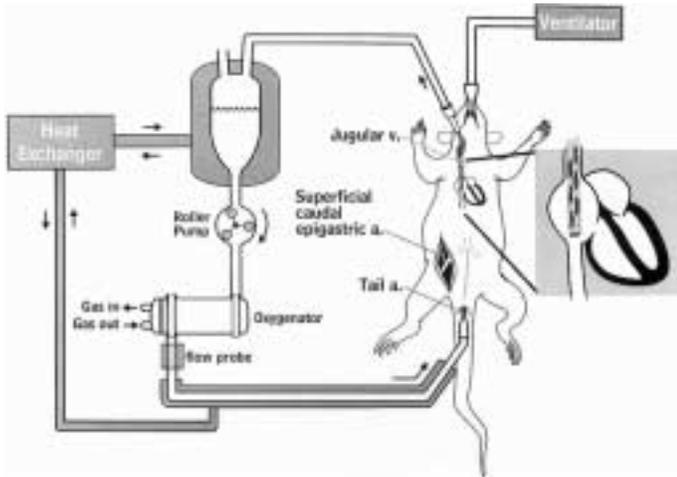


Fig. 1. Schema of cardiopulmonary bypass in a rat.

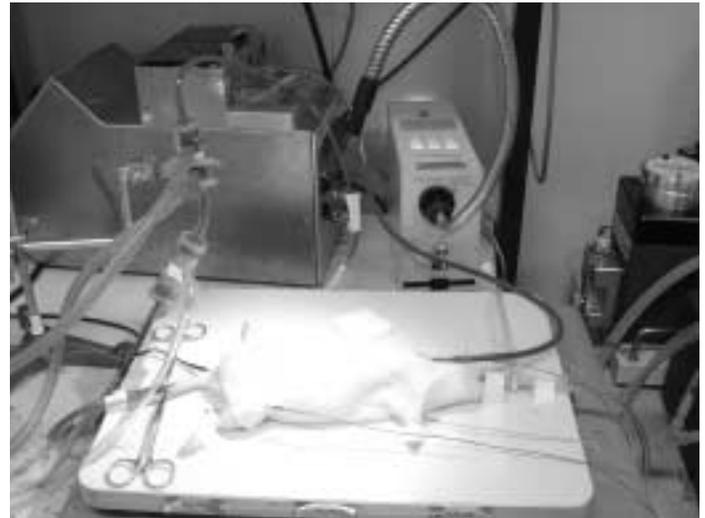


Fig. 2. Establishment of cardiopulmonary bypass in a rat.

脱血管及び送血管を抜去し、麻酔から覚醒させた後、ゲージにて飼育した。術後1, 3, 5, 7日目に標準化神経学的機能試験及び2種の迷路試験 (Morris water maze test) を行った^{6,7)}。標準化神経学的機能試験はneurologic performance scale, Functional disability scoresを用いて数値化した (Neurologic performance scale : 0-95, 0 = no deficit and 95 = brain death, Functional disability scores : score 1 = no disability; score 2 = mild disability; score 3 = moderate disability; score 4 = severe disability; and score 5 = death.)⁸⁾。

以上の試験はビデオ録画して、後に盲検となっている神経学者が一括して評価した。術後7日目に動物は犠牲死させ、脳の組織を採取し、海馬部の病理学検査を行った。

C. 結果

1. 人工心肺運転中の検査所見

HbV(-)prime, HbV(+)prime, sham surgeryの3群における人工心肺運転中の採血データを検討した結果, Arterial pHに関してはHbV(-)prime群でアシドーシスの傾向があった。これは血液希釈によるものと考えられた。またHbVの充填に関わらず, 人工心肺を運転した群に関しては人工心肺運転後においてArterial PCO₂の上昇を認めた。ただし, それ以外の大きな所見は得られなかった。3群ともいずれの症例も生存した。

2. 標準化神経学的機能試験および迷路試験

術後1, 3, 5, 7日目に標準化神経学的機能試験及び2種の迷路試験 (Morris water maze test) を行った。各群のswimming speedには有意差がなかった。標準化神経学的機能試験はNeurologic performance scaleおよび, Functional disability scoreを用いておこなったが, 3群とも有意差を認めなかった。

迷路試験は認知記憶の評価で行われるもので, 高次脳機能に関わる海馬の評価に用いられる。water maze test-1はFig. 3に

示すとおり, 円形のプールに浮島を設けたもので一般的にMorris water maze testと呼ばれるものである。この結果からHbV(-)prime群は, HbV(+)prime群及びsham surgery群と比較して有意に到着時間が延長したことが分かった (p=0.005)。またHbV(+)prime群とsham surgery群には有意差がなかった。water maze test-2はFig. 4に示すとおり, 実際に迷路を正方形の枠の中に作成したものである。11箇所のjunction pointを設けた。この結果からもHbV(-)prime群は, HbV(+)prime群及びsham surgery群と比較して有意に到着時間が延長したことが分かった (p=0.05)。またHbV(+)prime群とsham surgery群には有意差がなかった。



Fig. 3. Water maze test - 1

Neurocognitive outcome was assessed on the 1st, 3rd, 5th, and 7th days after CPB by visual-spatial learning with the maze test (Water maze test - 1)



Fig. 4. Water maze test - 2
Neurocognitive outcome was assessed on the 1st, 3rd, 5th, and 7th day after CPB by testing visual-spatial learning with the maze tests (Water maze test - 2)

3. 病理学的評価（海馬）

各群の海馬部においてヘマトキシリン・エオジン染色による病理学的評価を行ったが、異常所見を認めず、神経細胞数の比較においても有意差を認めなかった。

D. 考察

新生児及び乳児の先天性心奇形に対しての人工心肺技術と治療戦略は、この10年の間に急速に進化し外科的な治療成績を改善させてきた。しかしながら、全身的な炎症反応を起こすことなく人工心肺を用いることは未だ不可能であり、多くの終末臓器で多かれ少なかれ機能障害を引き起こす可能性がある。脳において、人工心肺の使用は脳血管内皮細胞機能と血流量を減少させる^{9,10}。これはno-reflow現象としてよく知られており、術後の脳神経障害との関連も報告されている^{11,12}。

血液希釈を可能な限り少なくするために、人工心肺充填量は回路の小型化によってかなり減少した¹³⁻¹⁵。しかしながら、施設間の差はあるにせよ現状ではかなり大きな乳児に対して無輸血充填が可能になっているにすぎず、それよりも小さい乳児及び新生児は種々の合併症のリスクがあるにもかかわらず同種血輸血の使用を余儀なくされている。人工心肺と同様に、同種血輸血も単独で全身の炎症性サイトカインを刺激し^{16,17}、脳血流とその機能に対してリスクになりうるという報告も近年増加している¹⁸。

人工酸素運搬体は、このジレンマを解決するひとつの手段である。かつてFluosolが心筋の局所灌流を増やす能力を調査する為に、ブタの人工心肺モデルが用いられた^{19,20}。しかしながら重篤な副作用によりFluosolの臨床使用は中止された。一方でIzumilは、イヌの急性期人工心肺モデルを用いて、同様の人工酸素運搬体が赤血球と同等の酸素運搬能を有していることを証明した²¹。HbVは他の多くのヘモグロビンに基づく酸素運搬

体にみられるような微小血管の血管収縮の副作用もない。

HbVを新生児及び乳児の人工心肺の充填液に用いるためには、使用後数日の間に生じる細かな副作用を如何に少なくできるかが鍵となる。HbVをラットに使用した今までの研究で、大量のHbVを短時間で注入することが主要器官の機能を軽度ではあるが一過性に変動させることがわかっている^{3,22}。したがって人工心肺運転後にmodified ultrafiltrationに準じた方法で²³、充填液から大部分のHbVを除去することができれば、これらの潜在的な副作用は極めて少なくできると考えられた。

我々のラット人工心肺モデルにおいて、運転中のヘマトクリットはおよそ10%で、一般临床上は輸血によって対処されるレベルのものであった。いずれの群のラットも7日間全て生存した。標準化神経学的機能試験においても有意差は認めなかった。手術7日後に犠牲死させた後に行った病理学的評価でも、3群間の所見は全て類似していた。HbV(-)prime群は、極度の血液希釈が生じており酸素供給に関して非常に不利ではあるが、標準化神経学的機能試験においては所見がなく、結果としてこの血液希釈は無症状だった。この結果は、我々のモデルが脳機能の微妙な損傷を見つける際に、非常に感度が高いことを示唆している。

学習と記憶は高次脳機能のうちの1つであり、これらを2つの迷路試験によって評価した。これらの結果、血液希釈を伴う体外循環が記憶学習機能に障害をもたらすと考えられた。人工心肺運転中における酸素供給のわずかな破綻が、他の標準化神経学的所見なしに、高次の認知機能障害のみによって発見されたことは、決して驚くべきことではない。

本研究の結果は、血液希釈を予防するためにHbVが同種血輸血の代わりに用いることができることを明らかに示している。認知機能評価の結果をふまえるとHbVの人工心肺使用は、潜在的に同種血輸血を充填液に使用するより優れていさえする可能性があった。

これらのデータの正当性を、今後より大きい動物の人工心肺モデルにて証明すると共に、脳酸素代謝と炎症反応に関してHbVの効果を評価していく必要がある。

E. 結論

ラット人工心肺モデルでのHbV使用は技術上問題なかった。このモデルにおいて、短時間の人工心肺運転であっても血液希釈を伴う体外循環は記憶学習機能に障害をもたらすと考えられた。一方HbVによる人工心肺回路充填で得られる酸素運搬量の増大が、高次脳機能の障害を軽減させる可能性が示唆された。

謝辞

HbVを提供して頂いた早稲田大学理工学総合研究センター名誉教授の土田英俊先生および関係者の皆様方に心より感謝申し上げます。本研究成果は、厚生労働科学研究費補助金により推進された。ここに記して謝意を表す。

F. 文献

1. Izumi Y, Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Yamahata T, Kato R, Nishide H, Tsuchida E, Kobayashi K. Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension. *Crit Care Med.* 1996; 24: 1869-1873.
2. Sakai H, Tomiyama KI, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Polyethyleneglycol-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug Chem.* 2000; 11: 425-432.
3. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial systems. *Am J Pathol.* 2001; 159: 1079-1088.
4. Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, Yoshizu A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface modification of hemoglobin vesicles with polyethyleneglycol and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90%-exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem.* 1997; 8: 15-22.
5. Grocott HP, Mackensen GB, Newman MF, Warner DS. Neurological injury during cardiopulmonary bypass in the rat. *Perfusion.* 2001; 16: 75-81.
6. Priestley MA, Golden JA, O'Hara IB, McCann J, Kurth CD. Comparison of neurologic outcome after deep hypothermic circulatory arrest with alpha-stat and pH-stat cardiopulmonary bypass in newborn pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 121: 336 - 343.
7. Mackensen GB, Sato Y, Nellgard B, Pineda J, Newman MF, Warner DS, Grocott HP. Cardiopulmonary bypass induces neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. *Anesthesiology.* 2001; 95: 1485-1491.
8. Baker AJ, Zornow MH, Grafe MR, Scheller MS, Skilling SR, Smullin DH, Larson AA. Hypothermia prevents ischemia-induced increases in hippocampal glycine concentrations in rabbits. *Stroke.* 1991; 22: 666-673.
9. Stump DA. Embolic factors associated with cardiac surgery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2005; 9: 151-152.
10. Wagerle LC, Russo P, Dahdah NS, Kapadia N, Davis DA. Endothelial dysfunction in cerebral microcirculation during hypothermic cardiopulmonary bypass in newborn lambs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 115: 1047-1054.
11. Langley SM, Chai PJ, Jagggers JJ, Ungerleider RM. Preoperative high dose methylprednisolone attenuates the cerebral response to deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000; 17: 279-286.
12. Mezrow CK, Sadeghi AM, Gandsas A, Dapunt OE, Shiang HH, Zappulla RA, Griep RB. Cerebral effects of low-flow cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1994; 57: 532-539.
13. Shapira OM, Aldea GS, Treanor PR, Chartrand RM, DeAndrade KM, Lazar HL, Shemin RJ. Reduction of allogeneic blood transfusions after open heart operations by lowering cardiopulmonary bypass prime volume. *Ann Thorac Surg.* 1998; 65: 724-730.
14. Merkle F, Boettcher W, Schulz F, Koster A, Huebler M, Hetzer R. Perfusion technique for nonhaemic cardiopulmonary bypass prime in neonates and infants under 6 kg body weight. *Perfusion.* 2004; 19: 229-237.
15. Karamlou T, Hickey E, Silliman CC, Shen I, Ungerleider RM. Reducing risk in infant cardiopulmonary bypass: the use of a miniaturized circuit and a crystalloid prime improves cardiopulmonary function and increases cerebral blood flow. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Ann.* 2005; 8: 3-11.
16. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hebert CA, Valente AJ, Baker JB. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest.* 1991; 88: 1362-1369.
17. Chai PJ, Williamson JA, Lodge AJ, Daggett CW, Scarborough JE, Meliones JN, Cheifetz IM, Jagggers JJ, Ungerleider RM. Effects of ischemia on pulmonary dysfunction after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1999; 67: 731-735.
18. Banks WA, Farr SA, Morley JE. Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation.* 2002- 2003; 10: 319 -327.
19. Engelman RM, Rousou JH, Dobbs WA. Fluosol-DA: an artificial blood for total cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1981; 32: 528-535.
20. Rousou JA, Engelman RM, Anisimowicz L, Dobbs WA. A comparison of blood and Fluosol-DA for cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Surg.* 1985; 26: 447-453.
21. Izumi Y, Yamahata T, Yozu R, Kobayashi K, Mukai M. The oxygen transporting capability of neo red cells(NRC) evaluated under total cardiopulmonary bypass. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 46: 30-37.
22. Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, Ikeda E, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E. Metabolism of hemoglobin-vesicles(artificial oxygen carriers)and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials.* 2004; 25: 4317-4325.
23. Naik SK, Knight A, Elliot MJ. A successful modification of ultrafiltration for cardiopulmonary bypass in children. *Perfusion.* 1991; 6: 41-50.

編集後記

去る8月24、25日に慶應義塾大学にて第13回日本血液代替物学会年次大会(大会長 末松 誠先生)が開催された。素晴らしいプログラムであったし、企業製造の酸素運搬体やリコンビナントアルブミンを用いた研究が加速してきた印象を強く感じた。今後これらの研究成果が本誌に続々と寄せられることを望みたい。実は、各巻の第2号は抄録号であるが、編集の都合で14巻では第1号が抄録号となった関係で本号(第2号)は通常

の号となった。四つの総説の内、最初の二つは13巻3号に掲載された「人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項(案)」を解説する」を薬事の視点から解説したものとFDAのガイダンス(案)の概説したものである。共に本学会の役割に関わる重要な総説と位置付けられ、多方面からの専門的なご意見をお寄せ頂きたいと思います。(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, 小林 薫, 酒井宏水, 寺嶋克幸, 堀之内宏久, 村田 満, 渡辺真純

日本血液代替物学会 会誌

発行 日本血液代替物学会

編集・制作「人工血液」編集委員会

印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.14(2) 2006年9月22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