

人工血液

第 16 巻 第 3 号 2008 年 11 月

目 次

特別座談会

世界初，遺伝子組換えアルブミン製剤の承認

はじめに大谷 渡 146

座談会太田 宗夫ほか 148

総説 臍帯血由来造血幹細胞からの赤血球と血小板の大量培養：

新しい輸血製剤の開発の期待松永 卓也ほか 162

海外文献紹介

ヘモグロビン内包リポソームによる脳への酸素供給：

出血性ショックラットモデルでのPETイメージングによる評価
.....宗 慶太郎 169

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 16 No. 3 November, 2008

Contents

Special Round-table Discussion:

*World's First Approval of Recombinant Human Serum Albumin
for Clinical Use*

PrefaceWataru Ohtani 146

Round-table DiscussionMuneo Ohta, et al. 148

*Review: Large-scale Production of Mature Enucleated Red Blood Cells
and Mature Platelets from Cord Blood Stem Cells: Looking
Forward to Development of New Transfusion Products*

.....Takuya Matsunaga, et al. 162

*Topics: Cerebral Oxygen Delivery by Liposome-encapsulated
Hemoglobin: A Positron-emission Tomographic Evaluation*

in a Rat Model of Hemorrhagic ShockKeitaro Sou 169

はじめに

田辺三菱製薬株式会社 研究本部 先端医療研究所
大谷 渡

遺伝子組換えヒト血清アルブミン（rHSA）製剤は、治療用途では世界で初めて承認された国産のアルブミン製剤である。

人血清アルブミン（HSA）は、主に肝臓で合成される蛋白質で、585個のアミノ酸からなる分子量約66.5kDaの糖鎖を有さない単純蛋白質である。生体内で最も多く、広範に存在し、膠質浸透圧の維持、循環血漿量の維持及び脂肪酸等の輸送などマルチな機能を有する蛋白質である^{1,3)}。

医薬品としての血漿由来人血清アルブミン（nHSA）製剤は、人血漿からコーンのエタノール分画により製造され、ウイルス不活化処理として、発売当初から60℃、10時間の液状加熱処理が施されている。このため、約50年にわたる臨床使用においても、ウイルス等の感染性物質が伝播したとの報告はなく、血漿分画製剤の中でも安全性の高い製剤であると認識されている⁴⁾⁵⁾。しかしながら、未知のウイルスやクロイツフェルト・ヤコブ病の原因物質であるプリオンなどについては、その伝播の可能性を完全に否定することはできない。また、血漿分画製剤の国内自給化は、わが国では1980年代から進められてきたが、nHSA製剤は、現在でもなお、その4割弱を海外からの輸入製剤に依存している状況である。

このように、nHSA製剤には、人血液を原料とすることに起因する安全性のリスクと、国内自給化の達成、という2つの課題を抱えているのが現状である。遺伝子組換え技術を応用し、製造段階で動物由来原料を用いないHSA製剤の開発は、この安全性の問題を克服し、さらに国内自給化の観点からも貢献できる薬剤となる。

我々がrHSA製剤の研究を開始したのは、1981年に遡る。nHSA製剤と同等なものを遺伝子組換え技術で作製することと、大量発現が可能な産生系と高純度精製方法の構築を開発の基本方針として、着手した。技術的に難易度の高い課題として、①非常に高い生産性（経済性）が求められること②大量に供給する必要があること③非常に高い純度が要求されることがあった。また、臨床試験において、数十グラムオーダーの大量投与遺伝子組換え製剤の前例がなかったことから、より安全性に配慮した慎重な開発が必要であった。

研究を開始した1980年代は、Lawnら⁶⁾により成熟HSAをコードするDNA配列を大腸菌プロモーターの下流に接続し、成熟HSAを大腸菌で発現させていた時期であり、これがrHSAの発現に関する最初の報告でもあった。しかしながら、菌体内での発現、つまり培地中への分泌発現ではないために、大量供給に必要なrHSAの商業化製造には全く不適であった。

その後、研究の進展により、大量の異種蛋白質発現株として*Pichia pastoris*酵母が注目されてきた。そこで、より高いレベルの発現が可能とされたピキア酵母の基本発現システムを1990年に導入し、改良を重ねrHSA高産生株を作製した。更に、培養方法の最適化、数段階にも及ぶ高純度精製方法を構築し、製法を確立した。また、世界最大規模の培養槽、精製と製剤化設備を有するプラントを北海道に完成させ、難易度の高いrHSA製剤開発の課題を解決した⁷⁾。

その後、1997年10月に製造承認申請を行った。審査において実製造規模で製造した治験薬を用いて更なる安全性の確認を行うこととなり、肝硬変患者を対象として追加臨床試験（生物学的同等性試験、繰返し投与試験）を実施した。rHSA製剤とnHSA製剤の生物学的同等性試験（各11例）では、 AUC_{0-168h} の平均値が、それぞれrHSA637.12 g・hr/dLとnHSA635.93 g・hr/dLで、90%信頼区間が92.9%-108.1%の範囲であり、生物学的に同等と判定した⁸⁾。また、繰返し投与試験では、肝硬変患者423例（のべ1053クール、3クール繰返し投与症例219例）に投与され、副作用は、423例中96例（22.7%）に認められたが、いずれも重篤なアレルギー様症状は認められず、各投与クール間で発現率に違いもなかった⁹⁾。

また、製造承認申請前には、膠質浸透圧の改善と循環血漿量の是正を目的として、熱傷、出血性ショック及び急性腹症患者を対象とした臨床試験を実施した。これは、世界で初めてアルブミン製剤の有効性を客観的に証明した試験であった。これらの試験は、太田宗夫先生（大阪府立千里救命救急センター 名誉所長）が中心となり実施されたものであり、当時のエピソードなどについては、本号の太田先生との座談会を通じて紹介する¹⁰⁻¹³⁾。

本剤（製品名：メドウェイ[®]注）は、治療用としては世界で初めて承認された大量投与遺伝子組換え製剤である。したがって、発売当初は、十分に安全性に留意しながら慎重にリリースし、市販後調査により使用実態下での安全性を確立していく。その後、欧

米等の海外展開ができれば、日本で確立した技術が世界の医療に大きく貢献できるものと期待している。また、将来的には様々な用途での利用も期待され、多くの研究及び医療の進展に寄与していきたいと考えている。

参考文献

1. Minghetti PP, Ruffner DE, Kuang WJ, Dennison OE, Hawkins JW, Beattie WG, Dugaiczky A. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J Biol Chem* 1986;261:6747-6757.
2. Peter T. Serum albumin. In Putnam FW ed. *The Plasma Proteins*, Second Edition, Vol. 1. New York :Academic, 1975;133-181.
3. Foster JF. Some aspects of the structure and conformational properties of serum albumin. In Rosenoer VM, Oratz M, Rothshild MA, eds. *The Albumin Structure, Function and Uses*, Oxford :Pergamon, 1977;53-84.
4. 脇坂明美. 血漿分画製剤の種類とその使用法. *産科と婦人科* 2002;8:1017-1024.
5. Tabor E. The epidemiology of virus transmission by plasma derivatives: clinical studies verifying the lack of transmission of hepatitis B and C viruses and HIV type 1. *Transfusion* 1999;39:1160-1168.
6. Lawn RM, Adelman J, Bock SC, Franke AE, Houck CM, Najarian RC, Seeburg PH, Wion KL. The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E.coli*. *Nucleic Acids Res* 1981;9:6103-6114.
7. 大谷渡. 遺伝子組換え人血清アルブミン (rHSA) 製剤 (メドウェイ®注) の開発. *Medical Postgraduates* 2008;46:1-6.
8. Ohnishi K, Kawaguchi A, Nakajima S, Mori H, Ueshima T. A comparative pharmacokinetic study of recombinant human serum albumin with plasma-derived human serum albumin in patients with liver cirrhosis. *J Clin Pharmacol* 2008;48:203-208.
9. Kasahara A, Kita K, Tomita E, Toyota J, Imai Y, Kumada H. Repeated administration of recombinant human serum albumin caused no serious allergic reactions in patients with liver cirrhosis: a multicenter clinical study. *J Gastroenterol* 2008;43:464-472.
10. 太田宗夫, 山本保博, 寺田浩明, 大友康裕, 湯浅晋治. 出血性ショックに対するGB-1057の第Ⅱ相臨床試験. *臨床と研究* 1997;74:2874-2883.
11. 太田宗夫, 山本保博, 寺田浩明, 大友康裕, 湯浅晋治. 出血性ショックに対する遺伝子組換えアルブミン (GB-1057) の一般臨床試験. *臨床と研究* 1997;74:2916-2927.
12. 太田宗夫, 山本保博, 寺田浩明, 大友康裕, 湯浅晋治. 熱傷受傷患者に対するGB-1057 [人血清アルブミン (組換え型)] の一般臨床試験. *臨床と研究* 1997;74:2928-2939.
13. 太田宗夫, 山本保博, 寺田浩明, 大友康裕, 湯浅晋治. 腸閉塞・急性膵炎などの急性腹症の患者に対する遺伝子組換え人血清アルブミン (GB-1057) の一般臨床試験. *臨床と研究* 1997;74:3149-3161.

以上

臨床開発の経緯と今後の期待について 救急領域の臨床試験責任者に聞く

座談会

（日時：平成20年6月6日，於：東京丸の内，三菱ビル コンファレンススクエアM+）

参加者：

- 臨床試験責任者： 太田 宗夫（東洋医療専門学校 学校長）＊
元編集委員長： 宮尾 秀樹（埼玉医科大学総合医療センター麻酔科 教授）
製品開発販売元： 大谷 渡（田辺三菱製薬株式会社 研究本部 先端医療研究所 グループマネジャー）
編集委員長： 酒井 宏水（早稲田大学理工学研究所 准教授）



左から，大谷 渡，宮尾 秀樹，太田 宗夫，酒井 宏水（敬称略）

＊ 太田 宗夫 先生のご略歴：おおた むねお（医博）昭36 大阪大学医学部卒，昭37 大阪大学第二外科，昭42 同特殊救急部助手，昭44 兵庫県立西宮病院救急医療センター部長，昭54 大阪府立千里救命救急センター所長（平13退官），平13 東洋医療専門学校学校長（厚生労働大臣指定校・学校法人東洋医療学園）。日本救急医学会 第十六回会長・名誉会員，日本外科学会 特別会員，世界救急災害医学会 第11回会長・副会頭，大阪府立千里救命救急センター 名誉所長，日本集団災害医学会 理事長，全国救急救命士教育施設協議会 理事長，鹿児島大学医学部講師，近畿大学医学部講師，園田学園女子大学教授，（株）ベネシス顧問，平19 叙勲 旭日小授章 受章，平19 ピーターサファ賞 受賞。

酒井■本日は皆様お忙しいところお集まりいただきまして、どうもありがとうございます。会誌編集委員会を代表しましてご挨拶させていただきます。

私は今年の4月に編集委員長になったばかりなのですが、今年の春に田辺三菱製薬(株)の遺伝子組換え人血清アルブミン製剤が発売されたことを記念して、「人工血液」に特集号として掲載しようということで、お話をいたしました。実は今回のインタビューの企画は、前々編集委員長だった宮尾先生がご提案をされたということで、ならばその宮尾先生にも出席いただいて開催しようということになりました。

そして、大谷先生に「どなたか、開発にあたった方で、救急領域で重要な方はいらっしゃらないか」ということをお願いしましたところ、まず太田先生のお名前が挙がりまして、本日も越えただいたというわけです。太田先生からは、遺伝子組換えアルブミンの開発の経緯、これからの医療における期待等、もれなくお聞きできればと思います。それでは宮尾先生、本企画の立案者として、ご意見をお願いします。

宮尾■ご紹介いただきました宮尾です。この企画は私が編集委員長のころ、もうそれこそ10年くらい前に、リコンビナントアルブミンが発売されそうだとということで、発売に合わせて救急領域の先生に対談のようなかたちでインタビューをしたかどうか、と企画をしていたものです。しかし、それからなかなか承認されなくて、やっとこの5月に発売されたということで、今回の企画となったのです。

人工血液というか、日本血液代替物学会そのものが最初は赤血球の代替物の開発を目指してできた学会なのですが、赤血球に限らず、血漿、血小板……人工血小板、抗体とか、血液全般を人工臓器という観点からとらえようということでフィールドがどんどん広がってきました。私は、麻酔科で輸液を研究しているのですが、輸液といっても晶質液と膠質液とありまして、とくに膠質液では最近いろいろな代用血漿剤が出ておりまして、日本でも新しく中分子から高分子の代用血漿剤が入ってくる。入ってくるといってもまだ臨床試験の段階なのですが。代用血漿剤そのものが、アルブミンを標的として、アルブミンの代用として使えないかということで開発されてきて、さらにアルブミンの代用としてだけでなく、たとえば、アルブミンより大きな分子の挙動とか、あるいは抗炎症作用とか、さまざまなことがいわれております。

ここでリコンビナントアルブミンが出たわけですが、日本のアルブミンの使用量が世界的に大きいということもありまして、アルブミンの使用を少なくするという意味と、もう一点は感染の危険がないとか、物性ではほとんどヒトアルブミンと差がないということで、これは研究領域、急性期医療の外科にしろ、麻酔科にしろ、非常に大きなインパクトを与えるのではないかと考えております。

太田先生には、救急領域のことはもちろんですが、医療全般のことをお話しいただけないかということで企画させていただきました。よろしくお願いいたします。

酒井■では、大谷先生の方から遺伝子組換え人血清アルブミン

製剤の開発の概略と、太田先生のご紹介をお願いします。

大谷■田辺三菱製薬株式会社 先端医療研究所の大谷でございます。本年5月19日に発売しました遺伝子組換え人血清アルブミン製剤の紹介をさせていただきます。私は、この研究開発に20年来携わり、主に精製および特性解析を担当しました。弊社での遺伝子組換え人血清アルブミンの研究着手から26年を経て、昨年10月19日、治療用として世界で初めて承認されました。市販名はメドウェイです。臨床試験は94年から97年までに、肝硬変、熱傷等の膠質浸透圧の改善を目的とする疾患と、出血性ショック等の循環血漿量の改善を目的とする疾患を対象として実施し、これらのデータをまとめて申請しております。そして、申請後の審査で本剤の繰り返し投与例が少ないということで、申請後に腹水を伴う肝硬変を対象にした繰り返し投与試験を実施しました。

効能・効果および用法・用量は既存のヒト血漿由来アルブミン製剤とほぼ同じです。しかしながら、本剤は動物由来原材料を使用していませんので、特定生物由来製品ではございません。用法・用量に関する使用上の注意としては、宿主であるピキア酵母によるアレルギーが起こる可能性が否定できないことから、本剤投与の際には、抗ピキア酵母IgE抗体を測定して、原則として陽性患者に投与を避けることになっております。市販後はピキア酵母成分に対する安全性を確認する目的ということで、目標症例数1万例の使用追跡調査を行います。

次に、太田先生がご実施された臨床試験を少し紹介させていただきます。先生は大阪府立千里救命救急センター長ご在任中に、先ほど説明しました本剤の開発治験のうち、5%製剤を用いた出血性ショック患者を対象とした第Ⅱ相の臨床試験および5%製剤、25%製剤の両製剤を用いた出血性ショック、熱傷、急性腹症を対象とした第Ⅲ相一般臨床試験を担当されました(文献1-4)。治験を始めるに際し、アルブミン製剤の有効性を検討した臨床試験データは国内外にありませんでした。さらに当時は、プロトコルを当局と相談する治験相談のような制度もありませんでした。そういうなかで、プロトコルの作成にあたっては世話人クラスの施設のデータを持ち寄っていただくところからスタートし、科学的に有効性を証明できる臨床効果の評価、指標の設定に際して、太田先生に大変なご尽力をいただきました。本治験に参加された先生方からは、世界で初めてアルブミンの有効性を客観的に証明した試験であったと絶賛されているということであります。以上が、先生のご紹介になります。

酒井■ありがとうございます。それでは、太田先生御願ひ致します。

太田■ご紹介いただきました太田でございます。私、元は外科医でございますが、1977年に救命救急の世界に入りまして以降、ショック等の重傷の救急患者を対象とした臨床に従事してまいりました。場所は今ご紹介いただきましたように主に、府立千里救命救急センターでございます。

私が外科医をやっておりました昭和40年頃ではなかったかと思うのですが、『Surgery』という雑誌がございまして、そこ

でアイデアの段階ですが、stroma free Hemoglobin solutionの代替血液としての可能性という、論文をみまして「こういう時代がくるのだな」と感じました。それから千里救命救急センターにまいりました後1980年頃に、フルオゾールDAという人工血液の治験に関わることができまして、人工血液というカテゴリーがこれからどうなっていくのかというようなところに、関心をもっていただけでございまして。そこへ、遺伝子組換え人血清アルブミンのお話を頂戴いたしまして、これは歴史的な仕事になるだろうと思いました。また、これに参加できるということ自体が将来、自慢のひとつになるだろうとさえ思ったわけでございまして、頑張ってみようという意気込みで参加させていただいたわけです。

92年に最初の会合を東京で実施しました。私がこのことを知ったのはおそらくその直前ではなかったかなと思うのですが、先見の明、新しい時代の到来を感じたように思います。これをご決断された方々の、ご決意そのものに敬意を表したいと思います。

Phase IIに入るに際しまして、様々な人たちに、このプロジェクトに参加していただきました。また追ってお話しいたしますが、いい結果を出すことができたことも自分自身の自負するところとされておりまして、それがやっと日の目をみたわけでございまして。考えてみますと、随分時間がかかったなという感じがしまして、待ちに待っていた10数年でございました。決して短い時間ではありませんで、私もだんだん、大丈夫かなというような気もいたしましたし、やっとできたな、という気もいたしましたし、ほっとしたなという気もいたしましたし、また反面、やったぜという気ももっていたわけでございまして。やっと日の目をみて、新しい福音といっていいと思うのですが、その登場を知っていただきたいなという気持ちであります。

酒井■臨床試験はいつから開始されたのですか。

大谷■1993年からです。研究開発は1981年から開始しております。それから数えますと27年になりますね。



宮尾■何回かお話に出てきていると思うのですが、これだけ時間がかかった経緯についてご紹介いただけますでしょうか。

太田■治験の実施に関しては、それほど遅滞があったとは思えないのですけれども。私の立場から言いますと、治験そのものは遅滞なく進みましたから、治験に時間がかかり過ぎたということではないと思っております。ですから、全体として遅れたことに、諸々の理由があったと思います。そのあたりは、大谷さんから説明していただいた方がよいと思います。

大谷■1997年に製造承認申請をいたしました。審査の過程で、特に安全性評価において、製剤の純度は高いが、グラム単位で大量に投与される遺伝子組換え製剤であるので、宿主であるピキア酵母に対するアレルギーが懸念されておりました。宿主に起因するアレルギーは本剤を何回か繰り返し投与することによって出現する可能性があります。そのため、繰り返し投与試験の症例数が申請時点は少なく、繰り返し回数も2回であったことから、3クール、できれば、5クールくらい繰り返すことによってアレルギーの発現状況をきちんと評価するようにとの指摘がありました。それに対してわれわれは追加臨床試験として3クール以上繰り返し投与を行う症例を、150例以上取得する治験を計画し、実施してまいりました（文献5）。その追加臨床試験を実施したということに一番時間がかかっており、その結果をまとめて当局に提出して、再び審査が始まった。ということで数年かかったわけでございまして。

また、追加臨床試験の実施前に動物試験での問題と、追加臨床試験実施中に抗ピキア酵母成分IgE抗体が高い健康成人男性を対象とした米国臨床試験（Phase I）での、アレルギー性副作用の問題とがありました。その際には、国内の追加臨床試験も途中で新規登録を中断しました。このような問題が発生したことが一番響いたと思います。なお、米国臨床試験で使用した製剤が国内臨床試験の治験薬と比べて、アレルギーの誘発原性が高いことが動物実験で判明しています。

いいかえれば、世界初の大量投与組換え製剤ですので、慎重の上に慎重を、ということで審査も慎重になされて、10年近くかかったということでございまして。これが通常の組換え医薬品製剤であるならば、おそらくすんなりと承認されたと思うのですが、前例がないような投与量の製剤であったというところで時間がかかったと認識しております。

宮尾■本剤の臨床試験は、肝硬変の患者さんの治験が最初だったのですね。

大谷■Phase IIとして、それが最初です。

宮尾■出血性ショックの治験と同時進行ですか。

大谷■出血性ショックは循環血漿量の是正を目的に、肝硬変は膠質浸透圧の改善を目的に同時に進行しております。

宮尾■アレルギーへの懸念があって、単回投与でなく複数回投与はその後にもう1回治験を組んだということですか。

大谷■開発開始時点から、繰り返し投与は計画されており、慢性期の患者さんでないと繰り返し投与できませんので、このような肝硬変の患者さんで治験を実施してきました。

宮尾■太田先生のご実施された治験には、7日間の、腸閉塞、

急性膵炎などの急性腹症患者さんを対象とされた一般臨床試験がありますが、これらは繰り返し投与を検討したのでしょうか…。

大谷■繰り返し投与というのは、一連の反復投与ではなくて、一定の間隔をあけて再び投与する場合を考えておりまして、肝硬変の腹水患者さんへ数日投与した後、しばらくして再度数日投与するような場合です。

宮尾■7日間投与するというのは繰り返し投与のなかには入らないのですか。

大谷■そういうようには考えておりません。抗原に感作され抗体が産生されるまで、しばらく経ってから投与するというのを繰り返し投与としています。

ですから、慢性の患者さんだけが繰り返し投与の対象になります。

やはり抗体が産生されるには2週間以上かかると言われておりまして、投与の間隔は2週間以上として繰り返し投与を行う試験を計画しました。

宮尾■アメリカのPhase I は、この治験が行われている時と、同時進行で行われていたのですか。

大谷■米国のPhase I 試験の話でありますとか、国内での肝硬変を対象とした繰り返し投与試験等の追加臨床試験というのは、1997年の申請後に実施しております。太田先生は1997年の申請までの治験に携わっていただいております。

宮尾■アメリカのPhase I につきましては、詳しいことは後でもう1回お聞きしたいと思うのですが、それが長引いたひとつの原因と考えてもよろしいでしょうか。

大谷■それも一因ではありますが、一番の理由は、追加臨床試験の実施であり、そのために実生産施設での治験製造のための検討、ピキア酵母成分抗体の特異的IgE、IgGを測定する試薬の作成検討、実施計画書の検討等の準備時間を含めて時間を要したと考えております。



宮尾■ 太田先生は、救急領域で臨床試験をいくつかなさっているわけですが、救急領域というのは、治験をやるのに一番大変な場所ではないかなと思います。インフォームドコンセントの問題、あるいは、インクルージョンクライテリア、エクスクルージョンクライテリアを、患者さんの救命を一番にしなきゃいけないところでいかに遂行するか。患者さんが生きるか死ぬかのような状況で、治験をなされたのは、本当に、頭の下がる思いであります。そのところ、プロトコル立案やインフォームドコンセントなどに関して、先生のご苦労話を少しいただけるとありがたいかなと思います。

太田■全体のデザインは、急性疾患と慢性疾患という分け方ができると思います。慢性疾患に関しましては肝硬変の患者さん、それからネフローゼ症候群の患者さんの方に、通常の投与が行われたのですが、私が担当いたしましたのは、急性疾患でございました。ショックとか、熱傷とか、急性腹症の患者さんを対象としたものです。ですから、根本的に対象そのものが違うので、まず苦労はそこから始まるのではないかと思います。

慢性疾患といえますのは、まず病院で通院されているような患者さんですから、そのなかから対象となる患者さんを選択させていただいたうえで治験を進めていくという手順になるかと思うのですが、急性疾患の患者さんは通院されているわけではありませので、いきなり来院された患者さんのなかから対象となり得る患者さんを選択していくことになります。そのため、まず治験の対象となる患者さんを見出すところから苦労は始まるわけです。

一般的に治験のデザインは、最初にいいものをつくっておかなければならないと思ひまして、一定のルールがあることは承知しているわけでございますけれども、行う側といたしましては目的が、確実に満足できるデザインでなくてははいけないだろうと思うのです。ところが、それが思ったようにはいかないわけでありまして、ある程度臨床的なものでやっていくことが、デザインの重要な点です。ですから、さまざまな指標に関しましても、できるだけ臨床的なものを選択するというかたちで、デザインしたわけでございます。

それから臨床を実施していただく方々の条件もありまして、そもそも救命医療の臨床をあまりご存じない方ができるようなものではございませんので、まず経験がたくさんおありになるという点が重要です。自分自身で評価ができるというのも大切なことで、これこそやはり経験があって、一定の評価の目をもっていらっしゃる方々にお願いすることが条件になりました。ですから、治験の評価につきましても、多少複雑でも皆さんには応じていただけるだろう。また、その意味を理解してもらえんということが重要と思ひまして、かなり難しい設定もしておりましたが、十分それに応じていただけました。ですから、いわば治験集団をまず編成するという最初の手順でした。経験があって、対象が絞り込めて、ある一定の症例数が確保できるというところを加味しました。

そして目的を理解して、同時にその目的が具体化されることについて一定の期待をもっていらっしゃるということも大事で

ございまして、何のためにこの治験をするのかな、というふうな気持ちで入っていただくのではなくて、この治験がうまくいったら新しい展開があるのだということを十分に理解して、期待をしていらっしゃる方々にお願いしました。

それから、地域性ということも大切でございまして、大都市圏だけでやるのではなくて、地方でもその地域のなかで信頼のある施設を選択させていただきました。そうすると、当然リーダー、施設のリーダーとしてしっかりした信頼のある方の存在を念頭に、施設を選定させていただいたということがあります。その方たちは学会である程度論議にも参加し、研究もされている方ということになりますので、必然的に活動的な救命センターと、救命救急医療をしっかりとやっていらっしゃる大学の救急部の先生方でかためさせていただきました。

従いまして、出た結果も私は信頼度が高いと思っています。デザインに関しましてはできるだけ臨床的に、やっていただく施設に関しましては信頼度の高いクリティカルケアメディスンをしっかりとやっていらっしゃる施設、これらが苦労の中心だったと思っています。皆さん、それに参加することについて意義を感じていただけたということが、うまくいったひとつの理由ではなかったかなと思いました。頼まれたからやるというのではなくて、これに参加することに、将来も含めた意義を感じていただけたということが重要でした。

宮尾■インフォームドコンセントがとりにくいような状況は、そういう救急領域ではしばしばあると思うのですが、たとえば厚生労働省の治験の報告なり、審査なりの時に、それは相当厳しく審査されたのでしょうか。

太田■インフォームドコンセントについては、施設の責任でございまして、ですから、しっかりとしたインフォームドコンセントをとるということを条件に、施設を選定しておりました。その点に関しましては、それぞれのご苦労はもちろんあったとお話しはうかがっております。何分、まだ存在しないものを説明するわけですから。ただ、今まで使っておりましたアルブミンと同一性というところが、われわれが自信をもってインフォームドコンセントがとれたことにつながったと思います。

酒井■実は人工血液についても、今後臨床試験をやらなくてはいけない時がくると思っています。太田先生の臨床試験の論文（文献1-4）を読ませていただいたのですが、比較対照群がないのですね。ヒト血清由来アルブミンとの同一性、同一試験ということで、全く同じものだという見解はあったと思うのですが。臨床試験のところで比較対照群が無いのは、どういうことなのでしょう。

太田■当初の計画では、人血漿由来アルブミン製剤との同等性を検証するために、膠質浸透圧の改善を目的とする疾患として肝硬変による腹水を選び、循環血漿量の是正を目的とする疾患として出血性ショックを選んで、それぞれで比較試験を実施する予定であったと記憶しております。しかしながら、出血性ショックの第Ⅱ相試験の結果より、総出血量のバラツキが大きく、比較試験を実施する上で必要な患者の背景を揃えるということとは困難であることや、先ほども申しましたように治療の緊急性

を要するために治験薬の割付けを行う余裕もなく、実際問題として現実的ではありませんでしたのでコントロールを置いた比較試験は実施しませんでした。なお、厚生省へ申請後の審査において、このことが特段問題にされたということはなかったと伺っております。われわれ自身も同一性というところを頼りにすると、現実に使っているものと、臨床的に問題になるような差異があるはずがない、ですから有効性等々につきましても、従来使っておるものとそんなに大差が出るはずがない、それを根拠にしたわけです。それで心配したのは安全性です。安全性というところは確かに、絶対的なものではないというかたちで臨みました。

大谷■われわれは、構造組成、物理的・化学的性質については、遺伝子組換え人血清アルブミンと人血漿由来アルブミンを徹底的に比較分析しました。とくに構造解析はX線結晶構造解析まで実施し、人血漿由来アルブミンと立体構造は同等であるというデータを取得しました（文献6）。臨床試験については安全性が一番重要だと思っています。

宮尾■その点ですが、元々のヒト血清アルブミンの安全性のデータがなかったせいで、結局リコンビナントアルブミンの有害事象ばかりが出てしまっています。ヒト血清アルブミンを使用した人はどのくらいの頻度で有害事象が出ているとか、比べられない。もうひとつは、肝硬変の患者さんに使用したことです。たとえば発熱とか、それこそ肝性脳症が1例で出たとか、こういうのは、治験の有害事象を全部出せとか、昔と少し違ったことがありますので。そういう意味で、安全性の面でもリコンビナントとヒト血清アルブミンのコントロールが必要だったかなと、結果をみて思いました。

結局、ヒト血清アルブミンのデータがないところでリコンビナントのデータだけとったわけで、肝硬変の人を対象にしたとか、あるいは急性出血を対象にしたとか、その病態特有の有害事象まであげなければならなかった。そのような治験のやり方は、リコンビナントアルブミンにとってはあまり嬉しくないことだという気がします。先生や、会社の方、どういうふうにお考えなのかなと。いかがでしょう。

太田■その点に関しましては、われわれ急性症例のなかにはとくにそういう問題は発生しておりません。慢性疾患における原因疾患に由来するのではないかと思われるようなものは、いくつか出ておりましたね。急性疾患の場合、原因疾患があるもので、由来するというものはまずなかったですね。

宮尾■この論文（文献5）にある臨床試験のまとめのところですが、727例のうち29例に発熱が出ていますね。4%ということは結構大きな有害事象なのですが、結局、これはほとんど肝硬変の患者さんから出ている有害事象です。こうやって数字に出されると、少し問題かなという気がします。急性期と慢性期と分けたデータを出すとか、そういうふうにしないと、「リコンビナントアルブミンは熱が出るのだな」と、普通の人から思われるわけですね。内容が分からない状態で、こういうかたちで副作用の記載が出ると、やはり少し問題かなと思います。「問題があるのだな」と思われてしまうところが、問題ではな

いかなと感じますがいかがでしょう。

大谷■血漿由来アルブミン製剤との比較試験は、肝硬変患者を対象として実施しており、この試験では有効性においては同等性を検証しており、副作用は両群同様の結果が確認されております。また、添付文書には、本剤の副作用情報全体をまとめて記載しております。因果関係が100%否定されなかった有害事象から、かなり疑わしい有害事象までが含まれております。

宮尾■急性期投与の方ではほとんどこういうのはなかったのですか。

大谷■臨床試験の大半が肝硬変の患者さんであり、また治験を実施した時代や治験デザインの違いもありますが、急性期の患者さんでは副作用は少なかったです。おそらく、先生方もご存じだと思うのですが、注射するだけで気分が悪くなる人とか、発熱する人とかおられると聞いております。

酒井■追求すれば、リコンビナントアルブミンはもっとアベレージが高いのだという、ポジティブなデータがでるのではないかと期待をしているのですが。

宮尾■おそらく、アルブミンじゃなくてPPF (plasma protein fraction) の場合、さまざまな不純物が入っていますから、それと比べるといいデータが出るとは思います。

太田■早い話が輸血だけでも、発熱は簡単に起こりますし、4%どころではないですからね。

酒井■ひとつ質問があります。一昨年の代替物学会でも、田辺三菱さんの発表に対して質問させていただいたのですが、X線結晶構造解析などをやっても同等という結果だということですね。しかし、リコンビナントアルブミンの方が圧倒的に純度が高いということですし、ヒト由来であれば元々のミュータントがあるということも聞いたことがあるのですが、そんなことはないのですか。

大谷■ミュータントはないですね。

酒井■あるいは多少、グリコヘモグロビンのようにグルコースが結合したり…、血漿由来というのは、リコンビナントアルブミンとは違うのではないかと。血漿由来は、不純物なり、夾雑物なり、修飾が加わっている点で違ってくるのではないかと。安全性を追求すれば、感染が無いことは当然のことなのですが、他の項目に関してもリコンビナントアルブミンではもっと安全性が高いとか、追求すれば良いデータが出るのではと期待しております。

宮尾■太田先生の治験のなかで、抗酵母成分抗体価を測ってらっしゃって、投与前、投与1カ月後、3カ月後をずっと測ってらっしゃるのですが、そこそこ、元々高い人と低い人として、高い人は投与前から200(AU)か300(AU)あるのに、低い人はそれこそ3.4(AU)とか、ピキア酵母の抗酵母成分に対しての抗体を元々もっている人と、もっていない人と、かなりバイアスが大きい感じを受けます。また、先生の治験の文献では、遺伝子組換えアルブミンに対する抗体は陰性であり、問題ないということを結論づけておられます。抗ピキア酵母抗体が、治験のなかでいろいろなデータが出てきたことに関しては、どういうふうに感じておられたのでしょうか。



大谷■太田先生の治験ではピキア抗酵母成分に対してはIgG抗体だけです。国内において遺伝子組換え製剤が上市され始めたのは1980年代に入ってからです。最初は大腸菌から遺伝子組換え製剤がつくられました。その後ワクチンなどが開発されました。それが酵母由来のものでした。開発時の臨床試験で、元々多くの正常人血清中に抗酵母IgG抗体があることがわかりました。その後、ピキア酵母を宿主とした遺伝子組換え製剤の開発に着手したのですが、パン酵母と同様に抗ピキア酵母抗体の存在が明らかとなりました。その理由の一つとして、他の酵母、たとえばパン酵母、真菌類のカンジタ、アスペルギルスに対する抗体との交差反応の可能性もあると考えています。

そういう方に対してアルブミンを投与して、もし惹起されれば、ブースターがかかって抗体価が上がってくるわけですが、そういうことが認められなかったということが、この結論になっています。

ただ、アレルギーの中では、I型アレルギーが重要であり、特異的IgE抗体をきちんと測るべきだろうということは申請後に当局の方から話がありました。申請前までは、そのピキア酵母に対する特異的IgE抗体を測定するシステムがなかったものですから、先ほどご説明しましたようなカンジタとか、アスペルギルス、それからパン酵母。そういうものに対するIgE抗体を測定するキットはございましたので、それらを用いて評価していました。申請後に抗ピキアIgE抗体を測定するキットを作成しまして、それで追加臨床試験の評価を行いました。

米国の臨床試験(Phase I)におきましては、ピキア酵母成分IgE抗体が陽性(0.7UA/mL以上)の方に投与しており、このピキア酵母成分IgG抗体は多くの方がもっていらっしゃいますが、ピキア酵母成分IgE抗体の保有者(0.35UA/mL以上)は約7%で、日本の追加臨床試験におきましても約8%でした。

宮尾■日本での太田先生の実施された治験に関して抗酵母成分IgG抗体が高くなっている。これは投与前と、1週間後にはか

なり上がっています。治験の論文にあるこのグラフですけど、100(AU) ぐらいから800(AU) まで上がっている人がいるのですよ。1週間後に。まあ、いろいろな結果があるのですけれど。

大谷■抗原の感作により、ブースター効果がかかったときに、何倍になるのかと考えると、それはオーダーが変わるのではないかと考えていました。ただ、太田先生に実施していただいた救急領域では輸血をされており、輸血無しに治験はできなかったのです。だから健常人の抗体価を測りますと低い人も高い人も1000倍くらい初期値が違うわけです。そうすると輸血した血液がどれくらい抗体価があったかは測定していませんでしたので、結果としてそういうことが起こっている可能性はあります。ただ、実際には患者さんにはアレルギー反応等何も問題となることは起こってはおられません。

宮尾■それではアメリカのPhase Iで4例中2例にアレルギー性の副作用が発現したと。そのあたりのところを少しご説明をお願いします。

大谷■申請後の繰り返し投与試験、すなわち、2週間以上空けて1日2バイアル3日間投与を繰り返す、腹水を伴う肝硬変の患者さんを対象とした試験と並行して、アメリカで安定化剤としての開発を目標に臨床試験を計画しました。本治験はハイリスクな患者さんを対象に安全性を検討することを目的とされたことから、ピキア酵母成分IgE抗体価の高い方を対象に実施しております。投与経路は、本剤をプリック、皮内、皮下、筋注、静注と、経路を変えながら投与量を増やして、1日で実施することとなっております。いわゆるチャレンジ試験でございます。

1例目の方は何事もなく終了しております。2例目の方は、生食で皮膚反応が出ておりました。その後、3例目におきまして、静注で2g投与する段階で気管支痙攣が発現しました。症状は、すみやかに通常の治療薬であるステロイド、あるいは気管支拡張薬等の投与による処置をして回復されております。この段階で治験担当の先生と相談させていただいたうえで、次に4例目の投与を行いました。再び同じ段階で、同様の気管支痙攣と全身性蕁麻疹が発現しました。この方も、同様の処置を行い回復いたしております。これがアメリカの試験の概略でございます。このようなことから、アメリカの試験はこの段階で中断しました。これと同時に日本で実施しておりました繰り返し投与試験は、この段階で約200例の投与が開始されておりましたが、新規の投与開始を中断して経過観察のみを行うことといたしました。そして当局への報告、相談を行いつつ、先ほど申しましたように製造方法の見直し等を行いました。すると、アメリカで使用していたものが日本で使用していた治験薬よりアレルギーの誘発原性が少し高かったということが判明しましたので、製造工程を見直した上で、国内臨床試験におきましてはピキア酵母成分IgE抗体を「事前に」測定して、陰性の方だけに投与するというようにプロトコルを変更して、治験を再開いたしました。その結果として、423例という多数データを集計することができました。

宮尾■そうするとそれ以降はIgGじゃなくてIgEを測定……

大谷■追加の繰り返し投与試験では、ピキア酵母成分特異的IgG抗体に加え、特異的IgE抗体を患者さんの推移データとして測定しておりましたので、投与した段階で陽性(0.35UA/mL以上)であった患者さんがおられました。しかし、アメリカの副作用でプロトコルを改訂した後は、投与するまで事前にピキア酵母IgE抗体検査を実施していただいて、陰性であるということを確認した上で投与していただくことになっております。

そのため、プロトコル改訂前にピキア酵母IgE抗体が検出された方が19例おりましたが、これらの方に投与しても問題はございませんでした。

宮尾■そうすると結局肝硬変の患者さんのデータでは、ピキア酵母成分IgE抗体が陽性の人でやっても、日本では副作用はほとんど出なかったということになりますね。これらのデータは太田先生がなさった治験の時には測定されなかった。

太田■少し原始的な話をうかがいますが、ピキア酵母というのは自然界ではわれわれの環境のなかにいるわけですか。

大谷■ピキア属は、味噌表面とか醤油に存在していると言われています。

酒井■北海道千歳市にある本剤の製造工場であるバイファに行ったことがありますけれども、味噌のにおいがしたのです(笑)。本当に。

太田■日本人には高い可能性がある？

大谷■そう思って測定していただいたのですが、特異的IgE抗体に関してはアメリカとそんなに差がなかったです。母集団の違いはあるので、わからないのですけれども。だいたい7, 8%ぐらいで、差はなかったです。

宮尾■ピキア酵母に対する特異的IgE抗体は7, 8%位であるが、特異的IgGはほとんどの方が保有しているということになるのですね。

大谷■そういうことになります。



太田■味噌、醤油ですか。同一のものではないのですね。

酒井■あのにおいは味噌のにおいでした。

宮尾■アメリカのPhase I 試験では、ピキア酵母成分IgE抗体をもっている方を特異的に選んで行ったら4例中2例に気管支痙攣が発現し、そのうち1例には全身性蕁麻疹も発現した。一方、肝硬変の患者の繰り返し投与試験は、それで一度治験が中断して、そこからはピキア酵母成分IgE抗体については投与の事前に測定するポイントを追加して陽性の人には投与しなかった。中断までの約200例では、検査項目としてピキア酵母成分IgE抗体を測定しており、結果としてピキア酵母成分IgE抗体陽性者にも投与しており、アレルギー様の皮膚症状も呼吸器症状も示さなかった、ということですか。

大谷■そういうことです。

宮尾■そうすると、「ピキア酵母成分IgE抗体をもっている人に投与しても安全」と考えてもいい、という結論にははいけないでしょうか。

大谷■とは言うものの、大量に投与する遺伝子組み換え製剤であること、やはり経緯からピキア酵母成分によるアレルギー発現の懸念が完全に払拭されないこと等から、慎重に投与していくべきであろうとの審査の結果から、抗体検査を行って、原則陽性者への投与は回避するべきであるとの結論にいたっております。

宮尾■それで、少し先走りになるかもしれませんが、市販後検査で1万例ちゃんと調べなさいという、そういう話になったと思うのですが、そのあたりの経緯を少し。

大谷■使用成績調査を1万例、安全性対策の一環として計画しておりました。審査の中でその調査の方法は、使用実体を反映できるように施設で使われた症例について全部調査するようにと施設単位の連続調査方式となりました。調査の内容はプロスペクティブに、適正使用のなかで先生方の使用されたデータを、安全性情報を中心に収集する調査です。このような調査の実施を含めて承認されております。ただし、使用成績調査につきましては、承認条件ではございませんので、添付文書上には記載されていません。しかし、会社の方としては慎重に販売して行く対応をとっております。

宮尾■ピキア酵母成分IgE抗体は、3種類測るとのことですか、そのあたりを具体的に。

大谷■一つは、ファディアという会社の、キャップ法を使用した方法がありまして、それはキャップ法測定試薬用の専用機器を使用し定量的に測定され、測定に数時間かかります。しかし、測定機器が医療機関に無い場合は、検査センターへの外注となりますので1～数日かかります。臨床試験ではそれを使わせていただきました。もう一つは、三菱化学メディエンスという会社がイムノクロマトを用いた方法で、それは血液を垂らし展開すると40分で判定が出ます。これは発色のバンドの有無で定性的に判定を見ることが出来ます。

宮尾■40分？

大谷■40分です。

宮尾■先生いかがですか。

太田■40分ですか。早いに越したことはないのですが、本来貴重な時間帯ですから微妙なところですね。ショック例の場合、最初の段階は乳酸リンゲル液の輸注が大原則ですので、40分の大半はその時間帯に入ります。アルブミンの必要性は輸注の効果が認められない、という判断によって決めますので、多くの場合、40分は許容範囲ギリギリというところですね。

宮尾■ピキア酵母成分IgE抗体陽性者を、測るのはいいですけどね、たとえばアメリカのPhase I の人のIgE抗体は投与後上がったのか下がったのかという、これは測っているのですか。

大谷■大きな変動ございません。

宮尾■感作されて上がったのではなく、元々の抗体の変動ということですね。

宮尾■今回の1万例に関しては、ない人に投与するということですね。投与した後に測るのですか。

大谷■投与に際しては事前に測定していただくこととなります。そして陽性者への投与は原則避ける。

宮尾■何年か見た方がいいのではないのでしょうか？ない人に入れた場合、繰り返し投与して上がってくるかどうか非常に大事です。

大谷■繰り返し投与をするときには、また測ってみてください。そのとき高かったら、基本的には避けてくださいということになっています。

宮尾■「陽性者へ投与する際もしくは緊急時等で抗ピキア酵母成分IgE抗体測定結果が得られる前に投与する際にはリスク・ベネフィットを考慮し、やむを得ない場合に限ること。」とあるがこれについては。

大谷■抗体検査は実施していただくこととなっております。しかしながら、アルブミン製剤なので、緊急の場合の使用もあり採血はしたが結果をみる前に投与しなければならないケース、または陽性の方に投与するケースが考えられる。そのような場合においては、その患者のリスクとベネフィット考慮して止むを得ない場合に限ることと注意喚起した記載になっております。

宮尾■さまざまな話を聞くと、日本で行われた治験ではほとんど何も起こってなくて、アメリカで4例中2例ほどあった件については、「製剤の違い」と会社側は説明している。アメリカで使われた薬が日本で使われたものより抗原性が高いということであれば、直せば、ほとんど問題なく使えるのではないかなという気がするのですが。先生もたくさんつかわれて、今までほとんど目立った副作用もなくつかわれていたということなので、これはアメリカの分だけが特殊だったのだと感じますが。

太田■何をしても起こるという人もいます。ところで、使用成績調査1万例というのにどれくらい時間がかかるかにも関心があります。

大谷■3年以内を予定しております。

太田■3年間じゃなくて、1万例が大事なのですよ。

大谷■1万例が大事です。それを3年以内で遂行しよう。そのため、本剤を慎重に使用していただき、徐々に広げるように考えておりますので、ご使用いただける医療機関の先生方には、

調査への協力を合わせてお願いしております。

太田■おそらく何も起こらないだろうという予測を、われわれはもっているのですが、1万例という縛りをかけられますと、それをどれだけ待たないといけないのかということになりますよね。それが3年間という少し長い気がしますけれども。

宮尾■日本発・世界初のリコンビナントアルブミンなのですが、世界に向けての戦略などは、会社としてはおもちでしょうか。

大谷■将来的な計画になります、まずは日本での安全性情報を集積してアレルギーへの課題対応を進めていくこととなります。しかし、ご存じのように、アルブミン製剤自体、さまざまな生物製剤の安定化剤や培地として用いられているところもございまして、追々、そういった面での展開も考えていかなければいけないのかなと思っております。

宮尾■先ほどピキア酵母に関して醤油とか味噌とかね、そういう話が出たのですが、アメリカと日本で相当食生活が違うから、やはりとりあえず中国とか韓国とか、わりと似た人種とか、食生活も似たようなところをターゲットにしていっていった方がいいのではないかと（笑い）いかがでしょう。

太田■アメリカで実施した試験以外には、「日本人以外に対して」というデータはないのですね。

大谷■ございません。そういう意味で、今一番安全な日本での安全性情報の集積を行いたいと考えております。途中でプロトコールを変更して、陰性の方以外に投与しないことと致しましたので、陽性者の使用経験が少ないという状況もございまして、すなわち最終的な製剤、一番良くなっていると考えている製剤においては陽性者の使用例がございませんので、今後1万例のなかで、万が一ピキア酵母成分IgE抗体陽性例に投与した症例がありましたら安全性情報を集積して、全体の安全性を評価していきたいと考えております。

宮尾■この727名のなかには、日本にいて、外国籍の方とか、そういう人はいらっしゃるのですか。

大谷■そういう方はおられなかったと理解しております。

宮尾■次に物性についての質問ですが、リコンビナントに限らず、ヒトアルブミンでもそうだと思いますけれども、いわゆる身体の中につくられたアルブミンの半減期は17日くらいだといわれておりますが、外から入った外因性のアルブミンというのは、半減期が短いというのをどこかで聞いたことがあるのですが、そういうことはあるのでしょうか。これはリコンビナントに限らないのですが。

大谷■昨年の学会で発表させていただいた試験結果ですが、メドウェイと血漿由来アルブミンの血中動態の同等性試験において8日目までの観察ですが、両群同等の推移を示したことが確認できております。

宮尾■それはヒトとリコンビナントの違いのことですか。私が聞きたいのはそうじゃなくて、外因性と内因性のアルブミンの違い。資料インタビューフォームの27ページにパラメータがあって、 $T_{1/2}$ がラットだと16時間から17時間。イヌだと160時間くらいなのですが、いわゆる、普通の身体の中かのアルブミ

ン、自分でつくったアルブミンの半減期が17日と考えると、短いのかなという気がするのですけれども。

大谷■これは動物に対して……

宮尾■ヒトに対するデータはないのです。アメリカのPhase Iをやっているのですが、Phase Iのリコンビナントアルブミン、おそらく同じヒト血清のアルブミンでも同じだと思うのですが、Phase Iのヒトの、半減期というのはいらないのですか。

大谷■国内Phase Iでも、外因的投与したアルブミンと、元から体内に存在していたアルブミンを区別できませんでした。

宮尾■もちろんできないですけど、入れたものの半減期がどれくらいかってことです。

大谷■半減期を検討しようと思しますと、かなり大量に投与しないと明確にならないと考えます。しかし、健康な方にそれほど大量に投与するのは問題かと考えました。

酒井■そもそもラベルのしようがないし。血漿由来と同一であれば検出しようがない。

宮尾■では、話題を変えまして、これからの救急医療、災害医療におけるリコンビナントヘモグロビンの役割、国際貢献、国際救援、について何か先生からご提言などを。

太田■それは災害時に、どこまで有用であるかという問題とイコールではないかと思うのですが、災害医療の考え方そのものが、阪神淡路大震災あたりから、だんだん変わってまいりましたね。国内の災害に関しましては、重傷で、頑張れば救命できるかもしれない、という一番キーになる対象（ご存じと思いますが、黒と赤とグリーンと黄色があるのですが、赤という一番重要な段階がございまして、これを助けられるかどうかにかかっているわけです）には遠慮は無用です。その赤について、「災害地のなかで救命しようとするのはやめよう」、「できるだけ早く非被災地へ転送しよう」、「生命維持装置だけをつけて、すぐ送り出してしまうおう」という考え方に変わってきたのです。非被災地に行きましたらアルブミンは十分確保できると思いますし。現地では乳酸リンゲル液だけで、処置してもらって、生命維持装置をつけて非被災地へ送ってしまうおうという考え方にまとまりましたので。アルブミンは非被災地へ転出された先で投与します。

それから国外の災害にもっていけるかどうかということですが、実は私、国際緊急援助隊という医療チームがございまして、ずっとそのリーダーをしていたのですが、そのとき適用があるかということですが、現実問題としましては、国外の災害に救援に行った場合、現地の医療レベルを超えてはならないという原則があるのです。現地がやっている医療以上のものを持込んではいないという考え方。そうするとアルブミンをもちだすというのは、少し難しい問題。ただ、例外がありまして、それは熱傷です。熱傷の場合はアルブミンが非常に大事でございまして、現地へアルブミンをもっていくことは大事だと私は思います。ひとつの例を申しますと、これはおもしろい話なのですが、インドネシアにメラピという火山があるのですが、それ

がしばしば爆発を起こすのです。噴火して、大量の熱傷患者が発生します。私のチームもその現場に出動いたしまして、熱傷の治療にあたったのですが、現地ではアルブミンをどう対処しているかというおもしろい話がありまして。枕元に卵を積んでいるのですね。そしてこれを食べろというのですね。患者さんの枕元にいっぱい卵を積みましてね、それでアルブミンを補充しなさいということなのでしょうね。そういうところにはアルブミンをもちこんでやるべきではないかと考えています。

もうひとつの例としてしましては、エホバですね。その方々が今関心をもってきているのかどうか、私は知りませんが、リコンビナントのアルブミンしか入れる方法がありませんので、彼らが受け入れるかどうかにかかっているわけです。

宮尾■リコンビナントアルブミンはOKです。

太田■何か情報、ありました？

酒井■毎年この学会の年会には、エホバの方々も参加しております。講演して下さったこともございます。

宮尾■エホバの人には、リコンビナントアルブミンはすごい福音です。

太田■ああ、そうですか。私も何度か、エホバの人たちと入れる入れないで、すったもんだしたことがあるのですが、やはり必要なことは必要なのですよね。

宮尾■災害地にもっていくことに関して、僕や酒井先生なんかは、実際のことについて全然よくわかりません。たとえばね、粉にするなんてことはできないですか。

大谷■凍結乾燥は可能です。しかし、再溶解したときに同じような物性になっているかどうか、確認したことはありません。いろいろ、検討すれば可能だと思います。

太田■25%製剤が一番濃厚ですね。

大谷■はい。

太田■あれを50%にするのは可能ですか。

大谷■今のところ40数%、50%弱くらいまでは可能と考えてます。



太田■75%分、水を同時にもっていかないといけないですからね。それをせめて半分にできればという気はしますね。

宮尾■落ち着いたらそのあたりのところを考えて……

大谷■可能性は……（笑い）

宮尾■先生、少し話は変わりますが、高張食塩水、災害現場の、高張食塩水についてはどういうふうにするのですか。

太田■そうですね、高張食塩水を現場で使うということになりますと、それなりの管理ができるということが条件になります。ですから、管理ができる場所へ高張食塩水をもちこむこと、これは意味があることだと思います。

宮尾■災害の現場から、病院に運ぶまでのボリュームに関しては、少量で細胞外液を増やすということで、僕らの感覚では、高張食塩水は災害の現場ではいいけれども病院に入ってから使うには少し難しいかなという気はしているのですが、さっき先生がおっしゃった、災害の現場で乳酸リンゲル液がたくさんありますけれども、高張食塩水だったらほんの少量ですむと言われています。

太田■まだ災害現場で高張食塩水がつかわれたという事例はありません。

宮尾■リコンビナントアルブミンは、いわゆる、今までの僕らが使っていた血漿由来のアルブミンと医学的にはほぼ等価と考えてよろしいのですよね。先生の先ほどのお話を総合しますと、ビキア酵母の抗原性の問題は抜いたとしても、先ほど不純物の問題はヒト血清の方が多いということですが、もうひとつは、医療経済の面で、薬価は、1万円はおそらく割っていると思うのですが、9千……

大谷■9,602円です。血漿由来品は5,619円から7,421円程度で、日赤は8,039円程度です。

宮尾■このあたりの薬価に関しては、先生はどのようにお考えですか。

太田■そうですね、そんなにお金のことを考えたことがなかったのですが、BSEフリーというところの価値を、どうとらえるかということにかかってくると思います。もしリコンビナントをつかわないでBSEあるいはウィルスに感染した場合、膨大な費用がついてまわるわけですから、そのことを考えると少々高くても選択する人が増えてくるのではないかと考えます。じゃあ、7,500円と9,602円の違いをどうとらえるかということになってくるわけですが、私はもっと差が出るような気もしていたのですが、意外に近いなあと。これだけの努力をして、たった2千円程度しか差がないか、という気もしないではないですね。

宮尾■普及には安い方がいいでしょうが、存続してきちんとやっていくにはそれなりの価格がないといけないかなと思います。当局と会社側の折衝で決まった値段だと思うのですが、先生のお立場として、リーズナブルな値段、もう少し高くてもいいのではないかなということでしょうか。

太田■もし私自身が投与していただくときになれば、問題なくリコンビナントをとりますね。2千円の差ですから。じゃあどこまで患者さんに理解していただけるかということになります

と、保険適用ですからある程度の負担で済むわけですね。だからこれはやはり「ウィルスに感染することはありませんよ」と、「問題を起こす可能性がゼロですよ」という話をすれば、患者さんはそちらを選択することになるのではないのでしょうか。

宮尾■今、非常に重要な発言をなされたのですが、ウィルスに感染する、あるいは、プリオン問題は今までどちらかというところまで臨床的には目をつぶっていたといったら変ですけども、あんまり話題にならなかったし、僕らもあんまりそこを気にしてつかってなかったのですが、この製剤でそこを前面に出してやってしまうと、「じゃあ今までは感染の機会があったの」と僕らも少し戸惑ってしまうところがあるのですね。そこは会社がどちらも販売されていますので、どういう販売戦略でいくのかなと。パルボウィルスとプリオンに関しては、今のアルブミンは完璧ではないということですか。

大谷■リスクがあると。

宮尾■リスクがゼロではないけれども。

大谷■ゼロではないけれども、リスクがあるという話はこちら、われわれの方ではできないのですけれども。

宮尾■それは何らかのデータをおもちですか。プリオンに関して、パルボウィルスのリスク……

大谷■資料はないのですけれども、ひとつ、ウィルスに関しては、ウィルス除去という工程で除去していくことと液状加熱。加熱で殺すなど、ありとあらゆる考えられる手段を講じて、今、安全性を高めています。現実問題、アルブミンにしてもグロブリンにしても、誰か感染したかという確認されてません。アルブミンに関しては世界で安全だと認められているので、おそらくウィルスに関しては大丈夫だろうと思いますけれども、ひとつ厄介なのはプリオン。プリオンに関しては高感度検出系がございませんので、いざ流行したときに、じゃあ本当に除去できているのかという、現実問題として測定できません。

宮尾■アメリカのなかでプリオンの発現率というか、そういうデータはあるのですか。

太田■プリオンの検出方法そのものが確立されていないですね。ウィルスに関してはどうなさっているのですか。パルボより小さいのはあるのですか。

大谷■以前は加熱だけで実施していたのですが、死滅しないようなウィルスがあったので膜など、原理を変えてやっているわけで。過去のものに比べたらさらに安全性の高いものに仕上がっています。それを言い出すと話がややこしくなるのですが、リコンビナントの場合は逆に酵母のアレルギーの懸念があるという。リスクというか、そういう可能性もあります。それぞれそういうリスクもあるし、ベネフィットもあるということです。

酒井■プリオンは、分子量が3万2千ほどの非常に小さなものです。アルブミンの半分です。ですからフィルターではなかなか除去できませんけれども、単体では存在しなくて、ある程度アグリゲーションになっているということで、除去方法は無いことはないみたいですが。スパイクテストを行って、除去工程を確認すると思うのですけれども。

大谷■血液製剤メーカーは、ウィルスを、プリオンを、スパイ

クして実際除去されたかどうか、絶えずバリデーションを実施している状況です。実験でしかわからないですから。

酒井■プリオンも対象でしょうか。

大谷■はい。

太田■今のところプリオンはないですよ、ということだけしか、リコンビナントのメリットはないのですか。

大谷■いえ、そんなことはありません。ウィルスも、これからどんなウィルスが出現してくるかも分かりませんので。そういうリスクは常につきまとうということです。

太田■エホバの話に戻りますが、そういう見解、皆さんもっていらっしゃるんですか。エホバの人たちは。

酒井■アルブミンは問題ないのではないですかね。

宮尾■一部、リコンビナントじゃなくてもアルブミンを入れるという人も確かいるのですね。血液はだめですけど、アルブミンだったら……

宮尾■では、リコンビナントだったら、ヒトの血液からとったものではないですからね。もう、彼らにとっては福音。

リコンビナントで量的にこんなにたくさん入れるのは初めてだという話がありましたが、少量のリコンビナント製剤は今までどういうものがどれくらいつかわれていたのでしょうか。臨床では……

大谷■最初はインシュリンとかワクチンとかが、遺伝子組換え技術で初めて医薬品として登場したのですが、その投与量はマイクログラムオーダーのものでした。それからエリスロポエチンなどが登場しましたが、その投与量も微量でした。1980年代当時、これらの薬価から単純に概算すると遺伝子組換え人血清アルブミン製剤は、数十億円の薬価になります。遺伝子組換え人血清アルブミン製剤の開発は、経済性が最も大きな課題の一つであることがお分かりになると思います。最近、抗体医薬がたくさん登場してくるようになりましたが、その投与量は数百ミリグラムぐらいです。薬価は非常に高く、それに比べたら、遺伝子組換えアルブミンの値段は決して高いものではありません。過去の遺伝子組換え製剤の中では、突出して安い製剤です。

宮尾■会社としてはペイするのですか。

大谷■ペイできるように技術開発をしてきました（笑）。

酒井■私は、ヘモグロビンとアルブミンを実験で扱うことができるのですが、思いますことは、この二つの蛋白質は非常に安定ですね。60℃で加熱ができるのです。ですから、他のマイクログラムオーダーの遺伝子組み換え蛋白質に比べると、製造工程は結構簡単ということはないのですか。精製が容易とか。そうでもないですか？

大谷■アルブミンは、活性がありません。他の蛋白医薬や抗体医薬は、活性が薬効に重要ですので、精製過程で失活してしまう危険性があります。その点、アルブミンは精製しやすいことはあるかもしれませんが、しかし、別の課題、つまり大量投与製剤ですので、高純度製剤でなくてはなりません。

宮尾■先生、この製剤の臨床領域全般における波及効果のようなものに関して触れていただければ。

太田■本当にほしいのはすべてのコンポーネント、血液のコン

ポーネントがリコンビナントでできるような時代がくればいいなという気がするのですが。それこそ先生、ヘモグロビンをなんとかしてもらわなきゃいけないのではないかと思いますのすけれども。

宮尾■リコンビナントのヘモグロビンも今、つくっている会社はあります。

酒井■大腸菌で、ですね。

宮尾■アメリカなのすけれど。

太田■今まで血液は人の善意に頼ってきたところがありますので、限界があるでしょうし、そんなこともあって、遠慮しながらついていたのは事実ですから。アルブミンも、本当はもっと使いたいと思う場面もあるのですが、日本人は使い過ぎだという話が出ますと遠慮しますよね。それから急性の血液浄化にアルブミンがこれからどんどんどんつかわれていきますので、総量はやはり減るのではなくてむしろ増えるのではないかと思います。そういうときにやはり人の善意に頼っているというのでは、さまざまな意味でヘジテーションがかかってしまうでしょうね。そういう意味では、広い使い方ができるということは期待するところでございます。どうでしょうかね、将来すべての血液の成分をリコンビナントで置き換えていくという。やはり、会社としては考えているのでしょうか。

大谷■アルブミンがあり、グロブリンがあり、今われわれが血漿由来製剤として製造されているものをすべて組換え製剤で製造できるように、いろいろチャレンジしてきたのですが、なかなか難しいです。投与量は多いのですが薬価が安く、製造コストを下げなくてははいけない。一方、抗体医薬は、非常に付加価値が高いです。

太田■もうひとつ聞きたいのは需給関係ですが、アルブミンに関する需給関係は、これから直接的に話題になってくる話なので。われわれは救急で相当血液を使いますので。ニーズが増えるとレスポンドできるのでしょうか。

大谷■弊社の現有設備では、年間製造量は100万バイアルです。それでも国内需給率のすべてを補うことはできません。ヒトの血液に頼るものではありませんので、設備投資すれば製造量を増やすことは可能です。

太田■投資できるかという問題……（一同笑い）

大谷■まず回収から始めないと（笑い）。

太田■元をとる……

大谷■元をとるのに少しお時間いただかないと。

宮尾■今、アルブミンの種類の話も出ましたが、僕自身は代用血漿に関心があります。日本でヒドロキシエチル製剤（HES）とそれからデキストラン製剤があります。昔はゼラチンもつかっていたのですが、今は日本ではほとんどゼラチンは市場から消えてしまったのですが、このあたりの代用血漿剤については先生何かご意見ございますでしょうか。

太田■腎不全が起きやすいという問題があって救急領域では、少し遠慮がちのような感じがいたします。もうひとつ、refillingの時期ですね。大量の水分を投与した後にrefillingが起こったときに、半減期の長いものが大量に流出するために心不

全が誘発されるというようなことも懸念したりするところですから、そのあたりが解決できればむしろ歓迎ではないかと思うのですが。

宮尾■日本ではほとんど麻酔科の領域でしかつかわれていないことです。とくにHESに関してはですね。欧米においてはHESも結構大量につかわれております。最近中国でものすごい勢いでHESがつかわれています。日本だけが特殊な状況にありまして、一番低分子のHESしか入手できない。他のどんな国も低分子から高分子までもっていて、中分子が一番つかわれているのです。そのうち日本でも高分子や中分子が入ってくる可能性もあります。おそらくこのリコンビナントアルブミンと、市場を競合していくような状況になるのかもしれないですね。ただやはり、アルブミンそのものは身体のなかにあるものですから、やはり使いやすい、使い慣れている、僕らも安心してつかえるというようなところがあります。今までお話を聞いて、ピキア酵母のアレルギーの問題も、おそらくクリアできるというふうな感じがいたします。ただ、棲み分けとか値段の問題とかさまざまな部分がありますが代用血漿剤の使用状況に関しては、日本はかなり特殊な状況ですね。

太田■少し偏見をもっているようなところがあるかもしれませんね。

宮尾■そうですね、学生、看護師、医者、パラメディカル、すべてHESは腎障害のイメージを引きずっています。

太田■伝統的なマイナスイメージですね。

宮尾■おそらく、40年ほど前に全世界的にosmotic nephrosisというのが話題になっていて、osmotic nephrosisの電子顕微鏡写真が与えた影響は大きいと思います。

太田■マクロライド系の抗生物質と一緒に使いますと腎不全がきやすいのかもしれませんが。

宮尾■腎臓に関して最近NEJMで敗血症の患者へのHES使用は腎障害を起こすという報告がありましたが、今までは腎障害に関しては注目されてなくて、どっちかという止血凝固系に影響を与えるというのがずっと前から知られています。それは裏返って考えると、今問題になっている血栓の予防にはなるのではないかなという話もあります。いずれにしるHESの話が本日の主の目的ではないのですが、先生のHESに対するお考えをお聞きしたいです。

太田■そうですね。そういうイメージが残っておりますね。

宮尾■また、リコンビナントアルブミンで、さまざまな新しい使い方がないかなと考えたりしているのすけれども、先ほど酒井先生から人工血液と、赤血球とコロボレートしてはどうかという話もありましたが。酒井先生、いかがでしょうか。

酒井■私は、ヘモグロビン小胞体という人工赤血球を研究しているのですが、赤血球と同じように微粒子ですので、それ自体、膠質浸透圧を持たないという特徴がございまして、大量に投与するにはボリュームを補うために膠質が必要と考えております。リコンビナントアルブミンが手に入る前は、血漿由来のプラズマカッターとか、ミドリ十字さんの製品を使っていたけれど、現在は、ある会社と共同研究できるようになりました



リコンビナントアルブミンを併用しております。この場合には血液とほとんど同じ粘度になります。最近、粘度というのは単に低い方が良いというわけではありませんで、血液と同じぐらいの粘度、あるいはそれ以上の粘度がないと、血流が保てないという新しい知見がございます。宮尾先生からお話がありました別の代用血漿剤HESと一緒に加えることにより、若干の人工赤血球の凝集があります。

太田■アグリゲーションを防止するということですね。

酒井■いえいえ、そうではなくて若干のアグリゲーションがあって、粘度が少し高くなるのです。粘度が高い方が血管の壁に対して、ずり応力を生じ、血管を拡張して血流を良くするということもあり、様々なバリエーションがあるのですね。研究の面では非常に注目されています。

それからあと、まだ研究段階なのですが、アルブミンの表面に、ポリエチレングリコール（PEG）を5本か6本くらい結合させたものです。これはアメリカのカリフォルニア大学サンディエゴ校で行われた実験ですが、ポリエチレングリコール修飾をすると、粘度と膠質浸透圧が高くなります。アルブミンは大きさとしては5、6ナノメートルくらいですが、PEGを結合させることで大きさとしては20ナノメートルくらいになります。ですから血管外漏出が抑制できるということ。膠質浸透圧が高いですから血圧も高くなり、粘度が高いですから、血管拡張が起こるとかさまざまなメリットがあります。今度リコンビナントアルブミンが世の中にでるということで、これを基本材料として、様々な修飾をして、もっと価値を高めるという研究が日本でも行われています。アメリカではリコンビナント体がありませんので血漿由来のアルブミンを使っているわけです。さまざまな発展的な話題が出て、リコンビナントアルブミンが研究者の手に行き届きますと、さらにまた新しい発展があるのではないかと期待をしています。

太田■臓器移植のお話になりますが、臓器を一定時間保存した

いわけです。そのとき人工血液のようなもので維持しておけば、24時間、48時間くらい、臓器を維持できると。そうなるとアメリカから日本に肝臓をもってくるのが可能になりますね。そういう使い方もある。

先生、ヘモグロビンの飽和度曲線は、まったく同じ？ 変わらないのですか。

酒井■ほぼ同じです。

太田■ほぼ同じ、ですか。コーティングしましても。

酒井■赤血球には、アロステリック因子として2,3-DPGがありますが、それはヘモグロビンを精製しますとなくなってしまうのです。そこで、ピリドキサルリン酸というビタミンBと類似のアロステリック因子があるのですが、それを一緒に内包させますと、ほぼ血液と同じカーブを描くようになります。

宮尾■最初の頃は酸素解離曲線を右に移動させていたのです。最近ではかえって左に移動させた方がいいとか、いろいろ中に入れるものによって、量と質によって、変動させることができる。

太田■スポーツマンなんかが歓迎するのではないですか。

酒井■そうですね、ツール・ド・フランスで、修飾ヘモグロビンを使用した選手がいたらしいのです。しかし、良い結果はでなかったらしいのですが（笑い）。

ドーピングです。シドニーでオリンピックが開催されたときに、アンチドーピング委員会が編成されたらしいのですが、以降それが機能しています。一度その人が早稲田にやってきて、「おたくの人工赤血球も将来つかわれるかもしれないから、その前に検出法を確立しなければいけない、少しサンプルを寄越せ」というのですね。

太田■酸素飽和度曲線は、右へ？ 左へ？ 移動しますか？

宮尾■どっちもできるのです。僕も最初リコンビナントヘモグロビンの話を聞いたときに、血管透過性のことを、いろいろ調べていたものですから、アルブミンを3つくらいくっつけば、血管外に出にくいのではないかなというような、そういうこと考えたりしました。やはりリコンビナントというのは加工がしやすいのではないのでしょうか。おそらく今は、「リコンビナントアルブミンは普通のアルブミンと同じようにつかえますよ、安全につかえますよ」というようなことがポイントだと思うのですけれども、その先に、「ヒューマンアルブミンよりもこういうメリットがありますよ」とか、それを越えることを考えていただきたいなと思います。そうすると新しい薬剤としての発展も非常に大きいのではないかと思います。先ほどの話題のPEG-アルブミンのデータは素晴らしいです。PEGをつけているせいで血管外に出ない。PEG-ヘモグロビンもPEGをつけることによって壊れないし、副作用も少ない。まわりを水で囲んでいるだけです。機能は果たすけれども、悪いことはしない。そういうおもしろい研究をサンディエゴでもやっていますし、早稲田でもそういう研究をやっています。

「同等ですよ」ということを証明した後は、「リコンビナントの方がいいですよ」というような研究を、ぜひやっていただければと思います。

太田■一酸化炭素とのアフィニティはどのようなのですか。

酒井■血液と同じですので、一酸化炭素というのは基本的に毒なのですが、製造の工程で一酸化炭素をつかっております。一酸化炭素と結合させるとアルブミンと同じように加熱処理ができるのですね。ですから60℃で加熱できるのです。

太田■そうですか。

宮尾■一酸化窒素と同じようにアフィニティあるのですけど、先生がおっしゃられたストローマフリーヘモグロビンがダメになった大きな原因は、血管外に出て、NOとくっついて、血管収縮して、血流を落っことしてしまうからダメになったということです。それを防ぐために早稲田が開発した細胞型のヘモグロビン、赤血球形のヘモグロビンというのは、大きいので血管外に出ないし、NOをくわない。赤血球より小さいですから、赤血球が通れないようなところでもいけるのではないかと思います。これは今、おそらく世界の人工血液のなかで一番進んでいるでしょう。臨床実験はまだされていないので、リコンビナントヘモグロビンと同じように、早稲田でもどうやって臨床にもっていったらいいのかということを考えていると思います。

酒井■最近スノーヘモグロビン（SNO-Hb）というのがありますが、同様にアルブミンでも、SH基がアルブミンの表面にあるので、そこにNOを結合させておくと、投与した後にNOがリリースされる。血管拡張作用などの効果を示すといった研究がありますね。熊本大学の小田切先生が取り組んでおられます。

体内でデリバリーとしてやっているわけですから、脂溶性の薬剤をあらかじめアルブミンに結合させておいて、それを投与するという使い方もあるのでしょね。

大谷■DDSのキャリアー蛋白質への利用は昔からよく言われています。以前は人血漿由来アルブミンしかごさいませんでしたので使用しづらいところがありました。これからはそういう研究を提案していただければ、こちらと一緒に……

太田■使用していただく量の問題もありますけれど、さまざまなところで利用されるということは、非常に大事ですね。

大谷■アルブミン製剤は、治療用では非常に大量に必要となります。DDS用のキャリアー蛋白質として利用するのであれば、付加価値は高くなり、企業にとってメリットがあるかと思います。

太田■そんな使い方もあるのですね。おもしろいですね。

宮尾■本日は貴重なお時間をいただきまして、ありがとうございました。それでは、対談を終わらせていただきます。

本当に難産の結果、この5月発売ということで、僕らも本当に期待しております。1万例のデータをきちんと測れ、ということでその点は少し足かせになるかもしれませんが、世界に向けて日本発の本当に素晴らしい製剤ができたということでぜひ、頑張ってくださいと思います。どんどん作っていただいて、僕らがどんどん使っても世界から文句を言われないうちに、そういうふうになればいいと感じました。どうもありがとうございました。

話題となった治験等の文献

- 1) 太田宗夫, 山本保博, 寺田浩明, 大友康裕, 湯浅晋治. 出血性ショックに対するGB-1057の第Ⅱ相臨床試験. 臨床と研究 1997;74:2874-2883
- 2) 太田宗夫, 山本保博, 寺田浩明, 大友康裕, 湯浅晋治. 出血性ショックに対する遺伝子組換えアルブミン (GB-1057) の一般臨床試験. 臨床と研究 1997;74:2916-2927
- 3) 太田宗夫, 山本保博, 寺田浩明, 大友康裕, 湯浅晋治. 熱傷受傷患者に対するGB-1057 [人血清アルブミン (組換え型)] の一般臨床試験. 臨床と研究 1997;74:2928-2939
- 4) 太田宗夫, 山本保博, 寺田浩明, 大友康裕, 湯浅晋治. 腸閉塞・急性膵炎などの急性腹症の患者に対する遺伝子組換え人血清アルブミン (GB-1057) の一般臨床試験. 臨床と研究 1997;74:3149-3161
- 5) Kasahara A, Kita K, Tomita E, Toyota J, Imai Y, Kumada H. Repeated administration of recombinant human serum albumin caused no serious allergic reactions in patients with liver cirrhosis: a multicenter clinical study. J Gastroenterol 2008;43:464-472.
- 6) 大谷渡. 遺伝子組換え人血清アルブミン (rHSA) 製剤 (メドウェイ®注) の開発. Medical Postgraduates 2008;46:1-6.

臍帯血由来造血幹細胞からの赤血球と血小板の大量培養 ：新しい輸血製剤の開発の期待

Large-scale Production of Mature Enucleated Red Blood Cells and Mature Platelets from Cord Blood Stem Cells: Looking Forward to Development of New Transfusion Products

松永 卓也, 藤見 章仁, 田中 育太, 新津 洋司郎

Takuya Matsunaga, Akihito Fujimi, Ikuta Tanaka, Yoshiro Niitsu

和文抄録

我々は、将来の新しい輸血製剤の開発を想定して、我々が以前に樹立した human telomerase catalytic subunit (*hTERT*) 遺伝子導入ヒト骨髓ストローマ細胞との共培養で大量に増幅した臍帯血由来造血幹細胞 (CD34陽性細胞) を更に培養して分化させ、脱核した成熟赤血球と血小板を *in vitro* で大量に作製することに成功した。本稿では、これまでの諸家の当該研究の成果の限界と、我々の研究成果と課題について述べる。

Abstract

Keeping the aim of developing a new blood transfusion product in mind, we succeeded in producing a large number of denucleated mature red blood cells and platelets *in vitro*. We accomplished this by amplifying umbilical cord blood-derived hematopoietic stem cells (CD34 positive cells) to a large number by co-culture with human telomerase catalytic subunit (*hTERT*) gene-introduced human bone marrow stromal cells that we had previously established, and further culturing them to induce differentiation. This paper describes the limitations of the relevant studies by other researchers, and the results and challenges of our research.

Keywords

hTERT stroma, Cord blood, CD34⁺ cells, Red blood cells, Platelets

1. はじめに

赤血球輸血は、交通事故等による大量出血、再生不良性貧血や骨髓異形成症候群などの慢性貧血、および化学療法や造血幹細胞移植後の重篤な骨髓抑制の際には、必須である。血小板輸血についても同様の適応があり、更に最近では、血小板が口腔外科領域の治療を含めた創傷治癒に有用であること¹⁾が報告されている。しかしながら、赤血球および血小板輸血製剤は、ともにボランティアの供血者由来であるため、しばしば、供給不足や感染微生物の混入のリスクがある。以上の理由から、新しい輸血製剤の開発が望まれるが、造血幹細胞から大量の赤血球および血小板を産生することができれば、その目的が達成される可能性がある。更に、赤血球に関しては、造血幹細胞から分化させて脱核した成熟赤血球を *in vitro* で作製できれば、赤血球

系細胞に感染する微生物の研究の推進に役立つ可能性がある。

2. 赤血球の大量培養

2.1 臍帯血CD34陽性細胞から *in vitro* で大量に作製した赤芽球の輸血製剤としての有用性の報告

Neildez-Nguyenら²⁾は、2002年にヒト臍帯血CD34陽性細胞から大量の赤芽球を作製し、それを免疫不全マウスであるNOD/SCIDマウスに静注することで、マウス体内で赤芽球が脱核して成熟赤血球になること、即ち、臍帯血造血幹細胞由来の赤芽球が新しい赤血球輸血製剤になりうる可能性を提唱した。

彼らは、以下の“three-step serum free culture system”を用いて大量の赤芽球を作製した。即ち、第1相培養 (day 0-7) では、臍帯血CD34陽性細胞をFlt3-Ligand (FL), Stem cell

札幌医科大学 内科学 第四講座 〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目 Fourth Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, School of Medicine, Minami 1-jo Nishi16, Chuou-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8543, Japan.

論文受付 2008年7月19日 論文受理 2008年9月12日

factor (SCF), Thrombopoietin (TPO) の存在下の液体培養で増幅させた。第2相培養 (day 8-14) では、第1相培養で増幅させた細胞をSCF, Erythropoietin (EPO), Insulin like growth factor-1 (IGF-1) の存在下の液体培養で赤芽球系前駆細胞に分化増殖させた。第3相培養 (day 15-21) では、第2相培養で得られた赤芽球系前駆細胞をEPOとIGF-1の存在下の液体培養で赤芽球に分化させた。細胞数はday 17の時点で20万倍に増幅された (Table 1.)。赤芽球への分化はday 7から明らか (70%) となり、更にday 10以降は、培養細胞の殆ど (93-99%) が赤芽球になった。Day 17の時点では、培養細胞の64%が好塩基性赤芽球、31%が多染性赤芽球あるいは正染性赤芽球、4%が脱核した成熟赤血球であった。赤芽球系前駆細胞が骨髓にホーミング及び定着する際に重要な働きをするケモカインレセプターであるCXCR4の発現は、培養早期に高値を示していた。即ち、day 7においては60%, day 10においては11%の培養細胞がCXCR4を発現していた。培養早期では、未熟赤芽球前駆細胞であるBFU-Eが主体であったが、その後の培養の継続で急激にその割合は低下した。Day 10には、後期赤芽球前駆細胞であるCFU-Eの割合が92%となり、day 14まで維持されていたが、CFU-GM等のその他の造血前駆細胞は消失していた。作製された赤芽球における、HbAとHbFとの割合は、臍帯血のそれと同等で、Hb switchが起こっていないことが明らかとなった。彼らは、更に種々のサイトカインの組み合わせで作製した赤芽球を脱核させて成熟赤血球を作製することを試みたが、不成功に終わっている。

Table 1. 造血幹細胞からの赤血球の大量培養の報告

報告者	造血幹細胞源	培養条件		増幅効果	HbF/HbA	文献番号
		血清の有無	ストローマの有無			
1. Neildez-Nguyen	臍帯血	無	無	赤芽球 20万倍	臍帯血 と同等	2)
2. Giarratana	臍帯血	無	有	赤血球 196万倍	臍帯血 と同等	3)
3. Miharada	臍帯血	有	無	赤血球 72万倍	臍帯血 と同等	6)
4. 我々	臍帯血	有	有	赤血球 350万倍	臍帯血 と同等	14)

彼らは、作製した赤芽球が輸血製剤として役立つか否かを明らかにする目的で、亜致死線量の放射線を照射したNOD/SCIDマウスに培養で得られた赤芽球を輸注し、経時的にマウスの各種臓器におけるヒト赤芽球および赤血球の存在をフローサイトメトリー法 (FACS) を用いて検討した。その結果、ヒト赤芽球は、マウスの肝臓および脾臓では検出されなかった。一方、マウスの末梢血液中においては、ヒト血球 (赤芽球と赤血球) を輸注後1日目では0.5%, 2日目では1%, 3日目では4%, 4日目では28%認めた。輸注4日目の時点で、マウス末梢血液中のヒト血球 (赤芽球と赤血球) は、輸注時 (day 0) の96倍まで増幅されていた。輸注後、3日目と7日目にヒト赤血球を

FACSでソーティングした後にHbA/F比を解析したところ、健常成人の末梢血由来赤血球と同等であり、Hb switchが起こったことが明らかとなった。更に、マウス末梢血中のヒト赤血球の酸素解離曲線が健常成人の末梢血由来赤血球と同等であることも確認している。

彼らの研究成果からは、健常胎児1名分に由来する臍帯血、即ち臍帯血1単位に平均的に含まれるとされる 5×10^6 個のCD34陽性細胞から、10日間の培養で1万倍の赤芽球が作製 (つまり 5×10^{10} 個の赤芽球) され、これを輸血することにより、 1×10^{13} 個の正常機能を有する成熟赤血球が作製可能である計算となる。即ち、臍帯血1単位から10単位の濃厚赤血球輸血製剤を作製できることになる。

しかし、彼らの輸血製剤は、輸血してから4日以上経過しなければ輸血の効果を発揮できないことから交通事故等の緊急輸血には不向きである。更に、我々はヒト臍帯血由来の赤芽球を彼らと同一の前処置を施したNOD/SCIDマウスに輸注して、マウス末梢血液中のヒト血球 (赤芽球と赤血球) の割合を1週間 (毎日) に亘り測定したが、全く検出できなかった。

2.2 臍帯血CD34陽性細胞からマウス骨髓ストローマ細胞株を用いて *in vitro* で大量に作製した赤血球の輸血製剤としての有用性の報告

上記のNeildez-Nguyenら²⁾ と同じ研究室のGiarratanaら³⁾ は、骨髓微小環境を模倣した培養条件、即ちサイトカインの存在下で骨髓ストローマ細胞と臍帯血CD34陽性細胞を共培養することで、脱核した赤血球を作製することを考えた。

彼らは、以下の“three-step serum free culture system”を用いて大量の赤血球を作製した。即ち、第1相培養 (day 0-8) では、臍帯血CD34陽性細胞をStem cell factor (SCF), Interleukin-3 (IL-3), Erythropoietin (EPO) の存在下の液体培養で増幅させた。第2相培養 (day 9-11) では、第1相培養で増幅させた細胞をEPOの存在下のマウス骨髓ストローマ細胞株であるMS-5あるいはヒト間葉系幹細胞との共培養で赤芽球系前駆細胞に分化・増殖させた。第3相培養 (day 12-21) では、第2相培養で得られた細胞をサイトカインの非存在下で、MS-5あるいはヒト間葉系幹細胞と共培養することで脱核した成熟赤血球を作製した。

Day 15の時点では、CD34陽性細胞は14万倍に増幅された。Day 8の時点で、95-98%の細胞は形態学的に赤芽球系細胞へ分化しており、その後急激に脱核を来して成熟赤血球となった。即ち、成熟赤血球の割合は、day 11で1-5%, day 15で65-80%に達した。Day 15の時点では、培養細胞の98%が網状赤血球であった。Day 15からday 18にかけて網状赤血球は成熟赤血球に分化した。Day 18の時点では、90-100%の培養細胞が成熟赤血球であった。Confocal microscopyで観察したところ、網状赤血球は“cup-shaped”であり、成熟赤血球は“biconcave”であることが確認された。造血前駆細胞 (BFU-E, CFU-E, CFU-GM等) は、day 8-11までに消失していた。なお、MS-5以外のストローマ細胞株 (ヒトストローマ細胞株; aSM-56, SV-

56, マウスストローマ細胞株; BSK-1, MSK, PT-67) には, 赤芽球を脱核させる能力を認めなかった.

産生された赤血球のHbA/F比は, 臍帯血と同等でHb switchは起こらなかった. 産生された網状赤血球と成熟赤血球における glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) および pyruvate kinase (PK) の含有量は, 健康成人の末梢血液中の新生赤血球のそれらと同等であった. 作製した網状赤血球および成熟赤血球の変形能をektacytometryで測定したところ, 健康成人由来の赤血球と同等であった. 更に, 作製した赤血球の酸素解離曲線が, 健康成人由来赤血球のそれと同等なことも確認した. 最後に, 作製した赤血球をNOD/SCIDマウスの腹腔内投与したところ, 投与後3日間マウスの末梢血液中に存在した. これは, 健康成人由来赤血球をNOD/SCIDマウスに腹腔内投与した場合と同様の結果であった.

この研究成果から, 健康胎児の臍帯血1単位に平均的に含まれるとされる 5×10^6 個のCD34陽性細胞から, 21日間の培養で 9.8×10^{12} 個の成熟赤血球が作製され, 計算上は, 4.9単位の濃厚赤血球輸血製剤を作製できることになる (Table 1.).

しかし, 彼らの輸血製剤の作製には, MS-5というマウスのストローマ細胞株を使用するという欠点がある. 更に, 我々はヒト臍帯血由来の赤芽球をMS-5と共培養して脱核を試みたが, 脱核が再現されなかった.

2.3 臍帯血CD34陽性細胞からストローマ細胞やマクロファージなどを用いずに *in vitro* で作製した赤芽球を脱核させ成熟赤血球の作製に成功した報告

従来から, *in vivo* においては, マクロファージと赤芽球との相互作用 (接着) が赤芽球の脱核を促進することが報告されていた^{4,5)}. また, 上記のGiarratanaら³⁾ の報告では, 骨髄ストローマ細胞あるいは骨髄間葉系幹細胞と赤芽球との接着が, 赤芽球の脱核を促す事が明らかにされた. 一方, Miharadaら⁶⁾ は, これらの赤芽球以外のfeeder細胞との共培養を行わず, 液体培養のみで, 臍帯血CD34陽性細胞から作製した赤芽球をほぼ100%脱核させることに成功した.

彼らは, 以下の “four-passage culture protocol” を用いて大量の赤血球を作製した. 即ち, passage I (day 0-6) では, 臍帯血CD34陽性細胞をSCF, EPO, IL-3, Vascular endothelial growth factor (VEGF) およびInsulin-like growth factor-II (IGF-II) の存在下の液体培養で増幅させた. VEGFおよびIGF-IIを添加した根拠としては, CD34陽性細胞にVEGF受容体-2およびIGF-I受容体が発現しているためと説明されている. Passage II (day 7-10) およびpassage III (day 11-16) においては, それぞれpassage Iおよびpassage IIの液体培養で得られた細胞をSCFとEPOの存在下で液体培養した. Passage IIIの終了時 (day 16) には, 培養細胞の87%がGlycophorin-A陽性, 78%がRh-D陽性, 20%が正染性赤芽球, 14%が脱核済みの成熟赤血球であった. Passage IV (day 17-20) では, “enucleation medium” を用いてpassage IIIで増幅された細胞の脱核を試みた. “Enucleation medium” の中には, mannitol, adenineおよ

びphosphate (MAP液), ヒト血漿製剤 (Plasmanate), グルココルチコイド受容体のアンタゴニスト (mifepristone) が含有されている. MAP液は脱核成熟赤血球の安定化, Plasmanateは培養細胞のviabilityの維持の目的に使用した. 従来から, グルココルチコイドは, 赤芽球系前駆細胞の増殖を促進し, 分化を抑制することが知られている⁷⁾. 彼らは, この事実から “enucleation medium” にmifepristoneを加えることにより, Plasmanateに含有されるグルココルチコイドの作用を抑制して, 赤芽球を効率的に分化させ, 更に脱核させることを試みた. その結果, passage IVの終了時のday 20においては, 培養細胞の80%が脱核成熟赤血球となり, 94%がGlycophorin-A陽性, 96%がRh-D陽性, 20%が正染性赤芽球であった.

この研究成果から, 健康胎児の臍帯血1単位に平均的に含まれるとされる 5×10^6 個のCD34陽性細胞から, 20日間の培養で 3.6×10^{12} 個の成熟赤血球が作製され, 計算上は, 1.8単位の濃厚赤血球輸血製剤を作製できることになる (Table 1.).

彼らの開発した培養法は, feeder細胞を準備する必要がないためより簡便で画期的な方法であるが, (i) 臍帯血1単位から得られる赤血球数が, 1.8単位の濃厚赤血球と少ないこと, (ii) mifepristoneという非生理的な物質を添加せざるを得ないこと, 等の短所がある.

2.4 ヒト骨髄ストローマ細胞との共培養で増幅させた臍帯血CD34陽性細胞を液体培養で赤芽球へ分化させ, 更にマクロファージとの共培養で脱核させ大量の成熟赤血球の作製に成功した報告

我々は, ヒト骨髄ストローマ細胞に不死化遺伝子である human telomerase catalytic subunit (*hTERT*) を導入し, ヒトストローマ細胞株を樹立し, それを用いたヒト臍帯血前駆・幹細胞の長期無血清培養システムを確立し, 2003年に報告した⁸⁾. 即ち, 我々は, *hTERT* 導入不死化ストローマ細胞 (*hTERT* ストローマ) が初代培養ストローマ細胞よりも長期間にわたり効率的に造血幹細胞を増幅する能力を有することを明らかにした. 我々は, この造血幹細胞増幅システムと1994年に我々が既に開発して報告した赤芽球液体培養システム⁹⁾ とを組み合わせることで赤芽球を効率的に増幅させた後に, マクロファージと共培養することにより *in vitro* で脱核させて大量の赤血球を産生させる “Three phase culture system” を着想した¹⁰⁾.

第1相培養 (day 0-14) では, 臍帯血CD34陽性細胞をSCF, TPOおよびFLの存在下で *hTERT* ストローマと共培養して造血前駆・幹細胞を増幅させた. 第2相培養 (day 15-28) では, 第1相培養で得られた造血前駆・幹細胞を含む細胞を効率的に赤芽球に分化させる目的で, diferric human transferrin, SCF, IL-3およびEPOを添加して, *hTERT* ストローマの存在下および非存在下で培養した. 我々は同時に, 別の健康人ドナーから提供された臍帯血CD34陽性細胞からマクロファージを効率的に作製することを試みた. 即ち, *hTERT* ストローマとの共培養 (第1相培養) で得られた細胞を, GM-CSF, M-CSF, IL-3, SCFを添加して, 10日間液体培養した (day 15-24). Day 24に

浮遊細胞およびプレートに付着している細胞を回収し、MACS CD14 Micro Beads (Miltenyi Biotec) を用いて、単球・マクロファージを製造者の説明書に従って純化した。単球を活性化マクロファージに分化させる目的で、得られた単球・マクロファージを Hashimoto らの方法¹¹⁾ に従って培養した。すなわち、単球・マクロファージをヒト AB 血清と M-CSF を添加した液体培養法を用いて、4 日間 (day 25-28) 培養して活性化マクロファージを得た。第 3 相培養 (day 29-34) では、第 2 相培養で得られた赤芽球を更に分化・増幅させるため、培養細胞を deionized BSA、ヒト AB 血清、diferric human transferrin, EPO、M-CSF を添加した液体培養法を用いて、day 25 から予め培養しておいた様々な細胞濃度のマクロファージに重層して共培養した。コントロールとしては、上記同様の条件で、マクロファージ非存在下で赤芽球を培養した。我々の予想に反して、第 3 相培養では 39% の培養細胞しか脱核しなかった。以上の理由から、第 4 相培養 (day 35-38) では、第 3 相培養で得られた赤芽球を上記の Miharada ら⁶⁾ の “enucleation medium” に浮遊させ、mifepristone の存在下あるいは非存在下で 4 日間液体培養して、脱核率の向上を試みた。

その結果、第 1 相培養で CD34 陽性細胞と総細胞数はそれぞれ 980 倍と 10,400 倍に増幅された (Fig. 1.)。第 2 相培養では、細胞数は 113 倍に増幅され、赤芽球に分化した。第 1 相培養で得られた細胞からマクロファージを得る目的で、GM-CSF、M-CSF、IL-3 及び SCF で培養したところ、75 倍に増幅された単球・マクロファージが得られた。第 2 相培養で得られた赤芽球を EPO の存在下でマクロファージと共培養したところ、赤芽球とマクロファージの数の比が、10 : 3 の培養条件で赤芽球の増幅率と脱核率がプラトーとなり、細胞数は 3 倍に増幅され、増幅された細胞の 61% が正染色赤芽球、39% が脱核赤血球となった (第 3 相培養)。この結果から、胎児 1 名分から得られる臍帯血 (5×10^6 個の CD34 陽性細胞を含む) から 6.0×10^{12} 個の赤血球の産生が可能であることが示唆された。これは、計算上ランダムドナーから得られる 3 単位の濃厚赤血球輸血製剤に相当する。

産生された赤血球は、ヘモグロビン含有量、酸素解離曲線が、

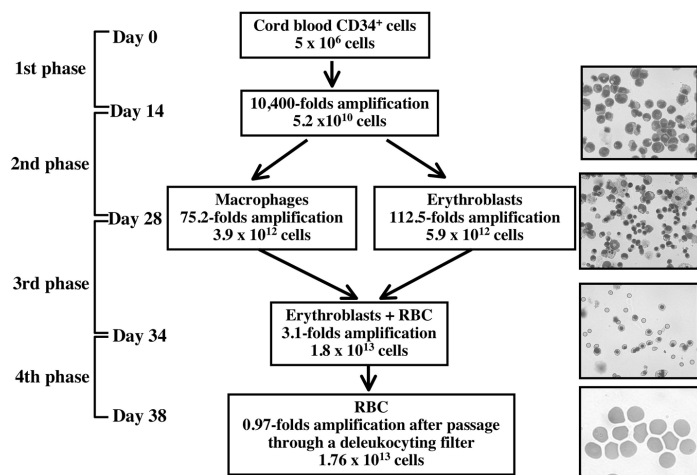


Fig. 1. The yield of red blood cells (RBC) by four-phase culture system.

健康成人由来の赤血球と同等であることを確認した。なお、産生された赤血球の HbA/F 比は、陽イオン交換 TSK gel G7 HSi カラム (Tosoh corporation, Tokyo, Japan) を用いた高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) により解析した。赤血球の Hb 含有量は、610nm の吸光度で測定した。赤血球における Hb の酸素解離曲線は、HemoX-Analyzer (Technical Consulting Service, Medical Products Division, Southampton, PA) を用いて解析した。更に、NOD/SCID マウス末梢血中における赤血球の動態を検討した。Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) より購入した 6-10 週齢の NOD/LtSz-scid/scid (NOD/SCID) マウスを用いた。赤血球をマウスに注射する前に、マウスの腹腔内に CL2MDP-liposome を 3 回 (赤血球注射の 5 日前, 3 日前, 前日) 投与してマクロファージを根絶させ、更に注射日に 3Gy の放射線照射を施行して、リンパ球機能を減弱させた。 1.5×10^8 個の CD34 陽性細胞由来の赤血球、健康成人赤血球あるいは CD34 陽性細胞由来の赤芽球 (day 28 に得られた培養細胞) を NOD/SCID マウスの尾静脈から注射した後、マウス末梢血におけるヒト赤血球の割合をフローサイトメトリー法でモニターした。マウスの後眼窩静脈叢からヘパリン加血液を経時的に採血し、抗ヒト Glycophorin-A (GPA) 抗体と vital nucleic acid dye LDS-751 (LDS) で二重染色した後、ヒト GPA 陽性細胞における脱核細胞 (LDS 陰性細胞)、即ちヒト成熟赤血球を解析した。その結果、NOD/SCID マウスにおける体内動態が成人末梢血由来赤血球と同様であることが明らかとなった (Fig. 2.)。しかし、赤芽球を注射したマウスにおい

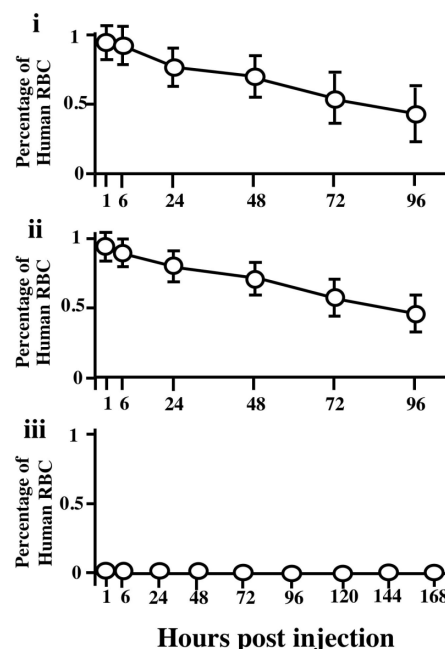


Fig. 2. *In vivo* clearance of cord blood (CB)-derived RBC in NOD/SCID mice. The percentage of human RBC in the peripheral blood of NOD/SCID mice injected with RBC derived from CB CD34⁺ cells (i), healthy adult human peripheral blood (ii), and human erythroblasts obtained on day 28 of the second-phase (iii). Data shown are mean $\pm$ SD of three mice and are representative of three experiments.

ては、1週間に亘り連日解析したが、ヒト成熟赤血球は認められなかった。

しかし、我々の予想に反して、第3相培養における脱核率が39%にとどまったため、第3相培養で得られた細胞を100%脱核させる目的で、Miharadaら⁶⁾が報告した“enucleation medium”を用いて、mifepristoneの存在下あるいは非存在下で4日間培養した(第4相培養)。その結果、mifepristoneの有無に関わらず、99%の培養細胞が脱核して成熟赤血球になることを明らかにした。この結果から、我々¹⁰⁾が考案した“four phase culture system”を用いると、胎児1名分から得られる臍帯血(5×10^6 CD34陽性細胞を含む)から計算上 1.76×10^{13} 個の赤血球の産生が可能となることが示唆された(Table 1)。これは、ランダムドナーから得られる8.8単位の赤血球製剤に相当する。

3. 血小板の大量培養

3.1 ヒト骨髓あるいは末梢血CD34陽性細胞から*in vitro*の液体培養で血小板を作製した報告

Zauliら¹²⁾は、TPOを添加した無血清液体培養システムを用いて*in vitro*で巨核球を作製し、更に巨核球からの血小板産生についても確認している。しかし、彼らのデータによると、1単位の血小板輸血製剤に含有される血小板数(2.0×10^{10} 個)を作製するためには、計算上1.0-3.0リットルの骨髓液が必要であり、実現するのは不可能と考えられる。Guerrieroら¹³⁾は、末梢血CD34陽性細胞をTPOとStromal-derived factor-1 α の存在下で無血清液体培養して巨核球を作製することに成功したが、得られた巨核球の数は、培養開始時のCD34陽性細胞数の僅か12倍であり、やはり臨床的な血小板輸血には応用不可能と考えられる。

3.2 ヒト骨髓ストローマ細胞との共培養で増幅させた臍帯血CD34陽性細胞をヒト骨髓ストローマ細胞との共培養で巨核球系細胞へ分化させ、更に液体培養することにより大量の血小板の作製に成功した報告

我々¹⁴⁾は、上記の*hTERT*ストローマを用いた造血幹細胞増幅システムを用いて増幅させた造血前駆・幹細胞を、TPOを添加した培養システムを用いて巨核球および血小板を大量に産生させる“three phase culture system”を開発した。

上記の赤血球の大量培養の時と同様に、第1相培養(day 0-14)では、臍帯血CD34陽性細胞をSCF、TPO及びFLの存在下で*hTERT*ストローマと共培養して造血前駆・幹細胞を増幅させた。第2相培養(day 15-28)では、第1相培養で得られた造血前駆・幹細胞を含む細胞を効率的に巨核球系細胞に分化させる目的で、SCF、TPO、FLおよびIL-11の存在下で、*hTERT*ストローマと14日間共培養した。第3相培養(day 29-33)として、第2相培養で得られた巨核球系細胞を(i) SCF, TPO, FL, IL-11あるいは(ii) SCF, TPO, FL, IL-11, FGF-4, SDF-1 α の存在下で、7日間培養して血小板の産生を試みた。なお、骨髓血管内皮細胞と巨核球を共培養すると血小板産生が促進することが報告されている¹⁵⁾ため、(1) 液体培養、(2)

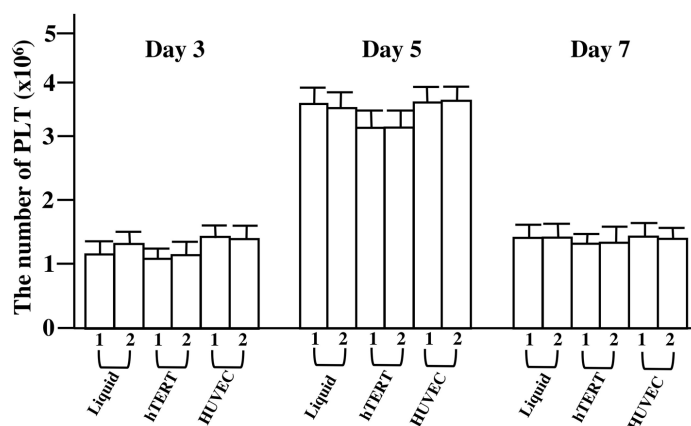


Fig. 3. Generation of platelets (PLT) from megakaryocytes with two different cytokine combination in the presence or absence of *hTERT* stroma or HUVEC. After 14 days of second phase culture, we transferred the unseparated cells to culture in which we used the cytokine SCF/TPO/FL/IL-11 (1) or SCF/TPO/FL/IL-11/FGF-4/SDF-1 α (2) without *hTERT* stroma (“Liquid”), with *hTERT* stroma (“*hTERT*”) or with IL-1 β pretreated HUVEC (“HUVEC”) and cultivated for another 7 days to generate PLT (Third phase culture), since it was previously reported that when megakaryocytes are cocultured with bone marrow endothelial cells, they efficiently release PLT into culture medium. We analyzed the PLT-sized fragments released to the culture supernatant on days 3, 5, and 7 by FACS and identified cord blood derived-PLT.

*hTERT*ストローマとの共培養、(3) 骨髓血管内皮細胞株であるHUVECとの共培養、において産生される血小板数を比較した。その結果、産生される血小板数は何れの条件を用いた場合も培養5日目にピークとなることが明らかとなった(Fig. 3)。上記で産生された血小板は遠心分離法(まず100g, 10分間でpelletとなった有核細胞を除去する。更に1,880g, 5分間でpelletとなった血小板をPBSに浮遊させて回収する。)で回収し、FACS解析する方法で算定した。血小板のFACS解析は、健常人の末梢血から分離した血小板をChoiらの方法¹⁶⁾を用いて行った。即ち、まずlog scaleのFSC/SCCのdot plot patternを用いて“血小板ゲート”を設定する。次にFITC標識した抗CD41抗体で染色した血小板(上記)をFL1のhistogramのpatternで解析する。即ち、CD41陽性分画を血小板として同定および算定する。下記の凝集能を解析する際に用いる血小板およびマウスに輸血する際に用いる血小板についてはChoiらの方法¹⁶⁾に則って、Sephacrose 2Bカラムを用いたgel filtration法を用いて回収した。

産生された血小板の機能解析としては、まず活性化能を解析した。即ちADPの添加によるP-selectinおよびGPIIb-IIIa抗原の発現増強の有無をFACSで確認した。次に凝集能を検討した。すなわち、Terasaki plateを用いて、ADPとフィブリノーゲンを添加した際の凝集反応を倒立顕微鏡下で観察した。この血小板凝集反応が抗GPIIb-IIIa抗体で阻害させることも合わせて確認した。

更に、産生された血小板のHLAの発現及び*hTERT*ストローマ細胞の混入をFACSを用いて解析した。

我々の研究結果からは、計算上、胎児1名分から得られる臍帯血（ 5×10^6 CD34⁺細胞を含む）から 1.26×10^{11} - 1.68×10^{11} 個の血小板の産生が可能であることが示唆された。この血小板数は、1名のアフェレーシスドナーから得られる血小板の6.3-8.4単位に相当する（血小板の単位数は日本赤十字社の基準で換算）。臍帯血から得られた血小板は、電子顕微鏡写真所見から、健康成人の末梢血液中の血小板と同様の形態を示す事が明らかになった。また、フィブリノーゲンとADPによる凝集能とP-セレクチンと活性化IIb-IIIa抗原の発現増強などの機能的にも、健康成人のそれと同等であった。作製した血小板の中にhTERTストロマ細胞の混入を認めなかった。HUVECとの共培養で血小板の産生が亢進することはなかった。

4. おわりに

最近では、我々が本研究を開始した頃には未だ明らかでなかったマウスおよびヒト由来のES細胞¹⁷⁻¹⁹⁾から成熟赤血球および血小板を大量に作製可能であることが報告されつつある。更に、今後はiPS細胞²⁰⁾から赤血球および血小板を作製する研究も精力的に行われることが予想される。しかし、これらの細胞には未だに倫理的な問題が解決されていない。我々の用いた、臍帯血CD34陽性細胞は、この問題をクリア可能であり、輸血製剤としての現実味がある。しかし、我々の培養方法には、(i) 培養日数が高い、(ii) 高価なサイトカインを大量に使用するなどの解決すべき問題が残されている。

謝辞

赤血球の酸素解離曲線を快く御測定頂きました早稲田大学理工学術院名誉教授土田英俊名誉教授ならびに酒井宏水準教授に深甚の謝意を呈します。

引用文献

1. Tozum TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: A promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc* 2003;69:664.
2. Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, Kobari L, Thierry D, Douay L. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2002;20:467-472.
3. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajcman H, Douay L. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:69-74.
4. Iavarone A, King ER, Dai XM, Leone G, Stanley ER, Lasorella A. Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by representing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature* 2004;432:1040-1045.
5. Kawane K, Fukuyama H, Kondoh G, Takeda J, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S. Requirement of DNase II for

definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 2001;292:1546-1549.

6. Mihaara K, Hiroyama T, Sudo K, Nagasawa T, Nakamura Y. Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:1255-1256.
7. Kolbus A, Blazquez-Domingo M, Carotta S, Bakker W, Luedemann S, von Lindern M, Steinlein P, Beug H. Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* 2003;102:3136-3146.
8. Kawano Y, Kobune M, Yamaguchi M, Nakamura K, Ito Y, Sasaki K, Takahashi S, Nakamura T, Chiba H, Sato T, Matsunaga T, Azuma H, Ikebuchi K, Ikeda H, Kato J, Niitsu Y, Hamada H. Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood* 2003;101:532-540.
9. Shintani N, Kohgo Y, Kato J, Kondo H, Fujikawa K, Miyazaki E, Niitsu Y. Expression and extracellular release of transferrin receptors during peripheral erythroid progenitor cell differentiation in liquid culture. *Blood* 1994;83:1209-1215.
10. Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M, Kawano Y, Nagaya T, Tanaka I, Iyama S, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Sagawa T, Sato Y, Takimoto R, Takayama T, Kato J, Gasa S, Sakai H, Tsuchida E, Ikebuchi K, Hamada H, Niitsu Y. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34⁺ cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol* 2008;87:339-350.
11. Hashimoto S, Yamada M, Motoyoshi K, Akagawa KS. Enhancement of macrophage colony-stimulating factor-induced growth and differentiation of human monocytes by interleukin-10. *Blood* 1997;89:315-321.
12. Zauli G, Vitale M, Falcieri E, Gibellini D, Bassini A, Celeghini C, Columbaro M, Capitani S. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood* 1997;90:2234-2243.
13. Guerriero R, Mattia G, Testa U, Chelucci C, Macioce G, Casella I, Samoggia P, Peschle C, Hassan HJ. Stromal cell-derived factor 1alpha increases polyploidization of megakaryocytes generated by human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2001;97:2587-2595.
14. Matsunaga T, Tanaka I, Kobune M, Kawano Y, Tanaka M,

- Kuribayashi K, Iyama S, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Takayama T, Kato J, Ninomiya T, Hamada H, Niitsu Y. Ex vivo large-scale generation of human platelets from cord blood CD34⁺ cells. *Stem Cells* 2006;24:2877-2887.
15. Hamada T, Mohle R, Hesselgesser J, Hoxie J, Nachman RL, Moore MA, Rafii S. Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J Exp Med* 1998;188:539-548.
 16. 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.
 17. Hiroyama T, Miharada K, Sudo K, Danjo I, Aoki N, Nakamura Y. Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells. *PLoS ONE* 2008;3:e1544
 18. Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Bertoni A, Stuhlmann H, Nakano T, Leavitt AD, Shattil SJ. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12819-12824.
 19. 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.
 20. Hanna J, Werning M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007;318:1920-1923.

ヘモグロビン内包リポソームによる脳への酸素供給： 出血性ショックラットモデルでのPETイメージングによる評価

Cerebral Oxygen Delivery by Liposome-encapsulated Hemoglobin: A Positron-emission Tomographic Evaluation in a Rat Model of Hemorrhagic Shock

Awasthi V, Yee SH, Jerabek P, Goins B, Phillips WT.

Department of Radiology, University of Texas Health Science Center at San Antonio,
San Antonio, Texas, USA.

(紹介者) 宗 慶太郎

Keitaro Sou

訳者のコメント

ヘモグロビン (Hb) をリン脂質小胞体に内包した酸素運搬体は、赤血球と同様の細胞型構造を有している。主に米国で開発が進められている非細胞型の修飾Hbの副作用が明らかになるにつれ、細胞型構造の重要性が強調されるようになってきた。Hbをリン脂質小胞体に内包する試みは、synthetic erythrocytesとして1977年に報告される¹⁾。1980～90年代にかけて米国海軍研究所 (Naval Research Laboratory) が赤血球代替物として利用するための開発研究を進めた。Naval Research Laboratoryで調製されていた製剤はLiposome-encapsulated hemoglobin (LEH) と呼ばれ、米国のいくつかの研究グループで安全性や有効性が評価されている。ここで紹介する文献の著者、W.T. Phillips (Dept. of Radiology, University of Texas Health Science Center, San Antonio) は核医学を専門とする臨床医であり、1988年頃よりNaval Research LaboratoryでLEHの開発を進めていたA.S. Rudolphとの共同研究を開始している。著者らが担当したのは放射化標識したLEH投与後の血中滞留時間と体内分布の計測であり、メトHbの還元剤としてHbと共に内包しているグルタチオンをテクネチウム-99mと複合化させることで、LEHを安定に放射化標識できることを見出している²⁾。LEHの膜成分はdistearoyl phosphatidylcholine, cholesterol, dimyristoyl phosphatidylglycerol, α -tocopherol (50:38:10:2, モル比) の4種で構成されており、粒子径300～700nm程度の小胞体にbovine Hbや架橋Hbを内包したものが報告されている。当時のLEHの血中半減期は20時間以内 (25% top-load in rabbits) であり²⁾、また投与後の補体活性化などの安全性の問

題が指摘されていた^{3,4)}。実際、投与中の心停止が頻発するため様子を見ながら低速での投与が必要であったと聞いている。この問題の原因として、負電荷成分としてdimyristoyl phosphatidylglycerolを使用していたことが挙げられる⁵⁾。

著者らは、補体活性化の回避と体内動態の最適化を目的としてLEHの脂質組成や粒子径の改良を行い、多量のポリエチレングリコール (PEG) (10 mol%) で表面修飾した小粒径の中性小胞体 (<200 nm) にHbを内包したLEHを調製し、血中半減期を65時間 (25% top-load in rabbits) まで延長することに成功している⁶⁾。しかし、酸素運搬体として利用するにはHb含量が低すぎる点が課題として挙げられている。Hb内包効率は、小胞体の粒子径、PEG修飾量、脂質膜の表面電荷に影響され、粒子径の減少、PEG修飾量の増大、中性小胞体はいずれもHbの内包効率低下の原因となる。血中滞留性の向上を目的に改良されたLEHの粒子径、PEG修飾量、表面電荷はいずれもHbの内包において極めて不利な条件であることがわかる。実際、報告されているスペックから換算すると単位総脂質量あたり内包できるHb量 (Hb/Lipids比) は0.1以下であり、Hb含量は1.2g/dLである⁶⁾。一般的に輸血のトリガーとされるHb値が7～8 g/dLであることを考えれば、このLEHを輸血代替物として利用するのが困難であったことは容易に想定できる。現在、Naval Research LaboratoryはLEHの開発を行っていないが、著者らは放射性同元素利用のイメージング技術による酸素運搬体の評価法確立のため、LEHを利用しながら研究を継続している。試料は一貫してLEHと呼ばれているが、酸素運搬体としての機能評価にはHb内包効率を上げる必要があり改良が続けら

れている。

国内では献血由来の期限切れ赤血球の有効利用という側面もあり、期限切れ赤血球から単離精製したHbをリン脂質小胞体に内包したHb小胞体の開発研究が進められてきた⁷⁾。一酸化炭素の利用によりHbの加熱処理を可能にするなどの技術進展により、超高純度・高濃度のHb溶液(>35g/dL)を得る技術が完成している⁸⁾。著者らが血中滞留性の向上を目的にLEHの最適化を試みたのに対し、Hb小胞体はいかにして多量のHbをリン脂質小胞体に内包するかという理工学の立場から脂質成分や調製条件の詳細検討が重ねられ、併せて医側からフィードバックされる投与試験の結果を反映させながら最適化が図られてきた。このため、Hb小胞体のHb/Lipids比は1.7~1.9まで向上しており⁹⁾、先に示したLEHの17倍以上の効率でHbを内包している。このようにHb小胞体とLEHは、日本と米国で各々の専門性を生かして研究開発が進められてきたが、細胞型酸素運搬体に関する基礎科学の進展は共通の課題であり、2001年より著者らのグループと共同でHb小胞体の血中滞留時間や体内分布の評価を行っている。この頃までには脱酸素化によるHb小胞体の長期保存(2年以上)の技術が完成していたため¹⁰⁾、調製したHb小胞体を海外に運搬輸送しての評価が効果的に行えるようになっていた。この共同研究により、赤血球代替物として大量に投与した場合、Hb小胞体の血中滞留時間は、血中滞留性の向上を目的として改良されたLEHと同等であることが明らかになっている¹¹⁾。この点は投与量の効果もあり、低用量投与ではHb小胞体の血中滞留時間が短縮されるのに対し、LEHは投与量によらず比較的長時間滞留する特徴を有している。

著者らがLEHの酸素輸送機能の評価に酸素の放射性同位体(¹⁵O, 半減期2分)を利用する研究を最初に報告したのは1997年であり、PET (positron-emission tomography) イメージングへの発展的研究と位置付けていた¹²⁾。本論文でそれが実現した格好となり、PETイメージングによる脳酸素代謝率の定量解析から、酸素運搬体の機能評価の結果が報告される。脳酸素消費量は、成人安静時で全身酸素消費量の約20~25%に相当する。脳酸素代謝率($CMRO_2$) = 脳血流量(CBF) × 動静脈酸素含量較差で求められ、PETでは動静脈酸素含量較差は脳酸素摂取率(OEF) × 動脈酸素含量(CaO_2)に相当する。CBFが減少すると、OEFを増大させて $CMRO_2$ を維持する。PETでは非襲侵で三次元的な脳血流代謝が定量的に測定され画像化でき臨床応用されているが、実験小動物は観測対象が小さいため、臨床用PETに比べ高い空間解像度と装置感度が技術課題とされていた。最近では実験小動物に対応できるまでに空間解像度と装置感度が向上しているので、酸素運搬体による治療法の研究開発、臨床評価に重要な手法になると考えられる。

この報告では、40%の出血性ショックの蘇生液としてヘモグロビン内包リポソーム、脱血液、5%アルブミン、生理食塩水が比較される。PETによる $CMRO_2$ の観測結果を比較すると、脳酸素代謝率の改善効果を認めるのは酸素輸送能のあるヘモグロビン内包リポソームと脱血液である。今回試験されたヘモグロビン内包リポソーム(Hb含量; 7.5g/dL)では、ラット血液

(Hb含量; 15 g/dL程度)と比較して脳への酸素供給能は劣るものの、Hb含量が血液の半分程度であることを考慮すれば妥当な結果といえる。この結果は、脳への酸素供給において、酸素運搬体のHb含量が重要な意味を持つことを示唆する。LEHにはPEG修飾の方法などに改良が加えられており、論文中に記載のスペックから換算するとHb/Lipids比は0.9程度まで向上していると見積もられるが、血液と対等に評価するにはさらにHb含量を向上させる必要がある。また、酸素親和度(P_{50})と脳への酸素供給能の関連も極めて興味深い点である。最近の研究から、組織の酸素化にHb小胞体の P_{50} が影響することは示されているが、赤血球より低い P_{50} が効果的な組織もあれば、必ずしもそうでない組織もあるようである¹³⁻¹⁵⁾。多量の酸素を消費する脳への酸素供給における P_{50} の効果は、酸素運搬体の開発において重要な指針の一つになると考えられる。細胞型酸素運搬体ではアロステリック因子の内包量により P_{50} を任意に制御できる利点を有しているため、今後の研究の進展が期待される。

また、コントロールとして設けた5%アルブミン投与群では血液希釈により $CMRO_2$ が低下する結果が得られている。従来、血漿増量剤による循環動態の改善は酸素供給に有利に作用する結果も報告されている。一見矛盾するようにも見えるが、この相違は出血性ショックにおける循環動態の臓器特異性を反映するのかもしれない。ショックにおいてもある程度循環動態が維持され、酸素消費量の多い臓器を観測対象とした場合、酸素輸送能を持たない血漿増量剤の投与は血液希釈による酸素供給の低下に作用し、他方、酸素消費量の少ない末端臓器を観測対象とした場合には末梢循環を回復させることが酸素供給に重要なものかもしれない。本論文では、ショック時における脳血流のデータがないため解釈が困難な部分もある。現状、全身的な酸素供給には酸素運搬能と膠質浸透圧が重要であることは確かなようである。詳細なデータは原文を一読されたい。

概 要

Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) はヘモグロビン(Hb)を人工脂質膜で被覆した低毒性のHb由来酸素運搬体(HBOC)として開発されている。酸素運搬体の一般的な評価法は、ショック動物モデルでの生理的代用指標に基づき、HBOCによる実質的な酸素運搬による組織レベルでの酸素代謝改善の評価は技術的に困難であった。本報では、40%の循環血液量減少性ショックのラットモデルでのLEHの¹⁵O-陽電子放射断層撮影(¹⁵O-PET)評価による所見を報告する。*In vitro*試験において、7.5% Hbと中性脂質(distearoylphosphatidylcholine: cholesterol: α -tocopherol, 51.4:46.4:2.2, モル比)で構成されるPEG修飾LEH製剤が効率的に¹⁵O標識酸素ガスを結合することを確認した。最終的にLEHを5%ヒト血清アルブミン(HSA)に分散させて膠質浸透圧を調節した。¹⁵O標識酸素ガスを吸入した麻醉ラット脳のPET画像は、LEH製剤の効率的な酸素輸送と供給を示した。PET画像から、ラット脳でLEHの酸素運搬能の直接的な指標として酸素輸送と代謝と同様に脳酸素代謝率($CMRO_2$)を測定した。対照輸液群(生理食塩水と5%のHSA)

と比較して、LEH投与群ではベースラインの80%程度まで有意にCMRO₂を改善した。一方、生理食塩水とHSAによる蘇生では、循環血液量減少によるCMRO₂低下の改善を認めなかった。脱血液による蘇生は酸素代謝の回復に最も効率的だった。これらの結果は、酸素運搬体と血液代替物の評価に¹⁵O-PET技術を適応でき、LEHによる蘇生が出血時の脳組織への酸素供給量を増大して、脳での酸素代謝を改善することを示唆する。

緒 言

出血性ショック蘇生の治療目的は、組織への灌流および酸素供給の維持である。晶質液や膠質液を投与する通常の治療法は出血性ショックでの電解質異常と循環量を補正するが、いずれも血流中の酸素運搬能増大には寄与しない。これらの輸液療法では、心負荷の増加により灌流圧を維持することで組織酸素供給を増大させている。一方、ヘモグロビン由来製剤と赤血球は灌流圧の維持に加え酸素運搬能も増大できる輸液である。

酸素運搬体を用いる蘇生術の重要な問題は、循環中の酸素運搬能と灌流組織での酸素利用の関係である。血液の酸素運搬能の増大が低酸素器官での酸素供給と消費の改善に反映されるかどうか明確にはわかっていない。小児の敗血症性ショック患者での臨床事例として、輸血によりヘマトクリットとヘモグロビン濃度を増大させたが酸素消費量の増加を認めなかったとの報告がある。代謝性酸素需要量が酸素供給を上回る状態としてショックを定義するなら、酸素供給と酸素代謝をモニターする意義はきわめて大きい。全身イメージングと従来の血流モニタリングとを組合せることで、出血性ショックでの酸素供給と酸素代謝のモニターができるかもしれない。

本研究では、脳酸素代謝を定量するために、最高水準の小動物用陽電子放射断層撮影 (PET) と生理的トレーサーとして酸素の陽電子放出同位元素である酸素-15 (¹⁵O) を利用した。酸素運搬体としてLiposome-encapsulated Hemoglobin (LEH) を使用し、40%循環血液量減少性ショックモデルラットに投与して、脳酸素消費量の改善能を評価した。また、コントロールの蘇生液として生理食塩水、脱血液、5%ヒト血清アルブミン (HSA) を使用し、LEHの性能と比較した。結果として、¹⁵O-PET技術が酸素輸送体や血液代替物の評価に利用でき、この評価法によりLEHによる蘇生が脳組織に酸素を供給して脳酸素代謝を改善することを実証した。

方 法

蘇生液

次の4種類の蘇生液を使用した。(1) Liposome-encapsulated Hemoglobin (LEH) ;[Hb]=7.5 g/dL in 5%ヒト血清アルブミン溶液 (HSA), (2) 生理食塩水, (3) 5%ヒト血清アルブミン (Albutein, Grifols Biological) (HSA), (4) 脱血液

¹⁵O-micro-PET技術によるLEH酸素輸送評価系

まず、外科的に無処置のラットでLEHの酸素輸送能と脳酸素供給のイメージングに対する¹⁵O-micro-PET技術の適応を試験し

た。サイクロトロン (Scanditronix model MC17F) で¹⁵N(p,n)¹⁵O核反応により生成した¹⁵O標識体を使用した。少量のLEHをトノメータ内で¹⁵O標識酸素ガスに5分間暴露して¹⁵O標識LEHを得た。Ketamine/xylazine混合液 (50 and 10 mg/kg) 筋注麻酔下のラットを、Rodent R4 Micro-PET検出器 (Concorde Microsystems, Knoxville, TN) に固定されたラットに対し、¹⁵O標識LEH LEH (0.5mL) を尾静脈から急速静注投与して4分間のイメージングを実施した。対照として、¹⁵O標識ラット赤血球を同様に投与し評価した。

出血性ショック動物モデルとPETイメージング

雄性Sprague-Dawleyラット (体重225-450 g) の左大腿静脈にカテーテルを挿入した。外科的処置によりカテーテルを挿入固定した後2日間の回復を待った。実験当日、ketamine/xylazine混合液 (50 and 10 mg/kg) 筋注による麻酔を行い、直腸温と動脈圧をデジタルモニターする装置類 (iWorx, Dover, NH) を装着した。Micro-PETイメージングのために、麻酔下の動物を保温ジャケットに包み、Micro-PET探知部に固定した。動物を安定化させた後、¹⁵O-PETイメージングを開始した (ベースラインスキャン)。特製のnose coneを使用し、ラットに¹⁵O標識酸素ガス (5 mL, 1.2mCi) を吸入させた。ヘマトクリットと動脈酸素含量を測定するため、血液 (0.2mL) を採取した。ベースライン測定終了後、カテーテルより循環血液の40%を0.5mL/分速度で脱血した。血液量は体重の5.7%として換算された。脱血後30分間安定させた後、二回目の¹⁵O-PETと採血を行った (脱血後スキャン)。脱血後スキャンの直後、脱血液と等容量の蘇生液を0.5mL/分で動物に輸注して蘇生させた。動物を安定させてから、¹⁵O-PETイメージングと採血を行った (蘇生スキャン)。

Co-Oximeter (Avox Systems, TX) により、採血液から動脈酸素分圧を見積もった。LEHがCo-Oximeterの機能に干渉するので、LEH製剤の循環動態を考慮してLEH投与群のHb含有量を見積もり、実験条件において95%Hb飽和を標準とした (式1)。LEHの血中半減期は30時間であり、投与後30~60分では99%の投与LEHが循環している。LEH投与群では、動脈血の酸素含量の算出にLEHのHb含量 (7.5 g/dL) を考慮した。LEHと脱血液のHb含量は一致していない。

$$\text{酸素含量 (mL/dL)} = \frac{\text{Hb 飽和度} \times [\text{Hb}] \times 1.34 + 0.31}{100} \quad (\text{式1})$$

ここで、0.31は大気中での酸素分圧 (100mmHg) における血漿への酸素溶解度である。

データ分析

脳酸素代謝率 (CMRO₂) はOhtaらのコンパートメントモデルによる数学的アルゴリズムで算出された。PETデータの解析は原文の付録AおよびBに詳細に記述されているので参照されたい。

結 果

LEHによる脳組織への ^{15}O 標識酸素運搬

^{15}O 標識LEHを投与したラット脳の ^{15}O -micro-PET画像は、脳に比較的強い ^{15}O 活性を示し、これは ^{15}O 標識赤血球を投与した時の画像と類似していた。LEHが赤血球と同様に生体内で酸素を運搬し、脳組織に送出していることは、これらの画像から明らかである。酸素ガスを ^{15}O 標識一酸化炭素(C^{15}O)に置換した場合、赤血球とLEHは強力に C^{15}O を結合した。静注された C^{15}O 標識赤血球は、一酸化炭素化赤血球の典型的分布を示した。すなわち、赤血球からごくわずかな C^{15}O しか放出されないため、 C^{15}O 標識赤血球画像は脳組織に僅かな ^{15}O 活性しか示さないことを特徴とし、大部分の活性は血管プールの中に残留した。 C^{15}O 標識赤血球の画像中では、頸動脈が明瞭に可視化された。

LEHによる脳酸素代謝の改善

ラット40%出血モデルで脳酸素代謝の改善におけるLEHの性能をモニターするため、 ^{15}O -micro-PETによるイメージングを実施した。この間、動物を麻酔下に保ち、バイタルサインを定期的に確認。温水ジャケットで中心体温を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持した。脱血後のヘマトクリットは脱血量に相当するレベルまで低下し、ベースラインと脱血後のヘマトクリット値において、群間での有意差はなかった。HSAとLEHによる蘇生後、ヘマトクリットは更に低下し、HSAの血漿増量による血液希釈効果を反映しているものと考えられる。同様の効果は生理食塩水で蘇生した群では観察されなかった。生理食塩水が組織液と急速に平衡化することにより、血管体積が減少したことが示唆される。脱血液による蘇生では、ヘマトクリットがベースラインまで回復した。HSA含有輸液(5%HSAとLEH)群と生理食塩水群間のヘマトクリットには、統計学的に有意差を認めた($P < 0.05$)。LEHで蘇生した動物の採血液を遠心分離した後、ヘマトクリット管の血漿層にLEHの存在が確認された。

出血ショックと蘇生における平均動脈圧(MAP)の変化では、脱血開始から失血量に相関してMAPが減少した。生理食塩水による蘇生では、わずかにMAPが改善されたが、5%HSAではベースライン値の80%まで部分的に血圧を回復することが可能だった。一方、5%HSAに分散させたLEHは、安定してベースライン血圧の90%までMAPを改善した。この結果は、血漿増量剤としてのこれらの輸液の性能を反映し、HSAとLEH群間の差はLEHの酸素運搬能に起因すると考えられる。脱血液が試験した輸液の中で最も優れた輸液であることは明らかであった。これらの結果は、急性出血性ショック処置のための血漿増量蘇生液に酸素運搬体を含有することの有用性を示す。酸素輸送能が急性失血に対する生理的フィードバックを緩和するためであろう。

1mCi ^{15}O 標識酸素ガス5mLを吸引させたラットのmicro-PET画像では心臓腔と脳組織が観測でき、脳と心臓心室領域について三次元画像解析を行った。心臓での時間分解 ^{15}O 活性は、速やかに上昇して急速な ^{15}O 活性の分配へと続く特徴を示し、これは典型的なinput曲線である。一方、脳での ^{15}O 活性は比較的

緩やかに短時間の平坦域に達し、その活性は ^{15}O 標識酸素が血管領域と平衡化される ^{15}O 標識水に代謝されるにつれて減少した。これらの曲線では、150秒を越えた部分は相当なノイズを認め、心臓でより顕著であった。これは、特に1s/フレームでの再構成では、拍動する心臓では単一の動脈領域の選択が困難なためである。もう一つの理由は、 ^{15}O 活性(物理的崩壊半減期2分)の急速な分配と崩壊である。

Ohtaのモデル(*J Cereb Blood Flow Metab* 12, 559, 1994)を基にしたMATLABプログラムにより、時間分解曲線のデータから脳酸素消費量(CMRO_2)算出した。生理食塩水と5%HSAで蘇生後の CMRO_2 は脱血後の CMRO_2 と同等ないしむしろ低下し、 CMRO_2 の回復を認めなかった($p < 0.05$)。一方、LEHで蘇生後の CMRO_2 は脱血後の CMRO_2 に比して有意に高値を示し($p < 0.05$)、ベースラインの80%まで CMRO_2 を回復できた。脱血液で蘇生した場合、 CMRO_2 はベースライン以上に回復した。これらの結果からLEHが組織に酸素を輸送できることは明らかであり、酸素供給により酸素代謝が改善される。しかしながら、酸素代謝の回復において、新鮮な脱血液の有効性には及ばない。本研究は、出血性ショックモデルでの脳酸素代謝の改善において、人工酸素運搬体の生体内での有効性を示す初めての研究である。また、本研究で使用した ^{15}O -PETイメージング技術は、他の代用血液または酸素運搬体の酸素供給能の評価に利用できる。

考 察

健康成人での安静時酸素運搬量(DO_2)は $\sim 1\text{ L/分}$ である。運搬された酸素の $\sim 25\%$ が組織で抽出され、残りの75%は静脈血に留まる。ある点まで DO_2 が減少する場合には、酸素抽出量(OER)が増大するため、酸素消費量はほぼ一定に保たれる。しかしながら、この関係の範囲は組織間で異なり、低酸素の程度に依存する。例えば、高度に低酸素の脳では、OER増大は運搬量の不足を補償することができず、酸素消費量が減少する。出血が生理的適応可能な機構を超える時、適切な酸素輸送を維持するために酸素運搬体による蘇生術が必要になる。

DO_2 は心拍出量と動脈血酸素含量(CaO_2)の積として算出される。従って、心拍出量か CaO_2 を増加させることによって組織酸素輸送を増大できる。しかしながら、ある点を越えると、心拍出量の増大は実質的にショック状態を悪化させる。酸素運搬能の改善による CaO_2 の増大に注意が注がれるのはこのためであり、人工酸素運搬体の開発では CaO_2 の増大を目標とする。

他のヘモグロビンを主成分とする酸素運搬体(HBOCs)と同様、LEHは出血ショックの動物モデルで広範囲に前臨床評価されている。前臨床から臨床段階への移行に成功した酸素運搬体の評価は、蘇生術の後の代用指標に基づいていた。いくつかのHBOCsが臨床治験に進んでいるが、投与後の脳の酸素輸送と代謝の実質的な改善は実証されていない。効果的な酸素運搬体が必ずしも効果的な酸素供給体であるというわけではなく、更に、効果的供給が必ずしも酸素代謝の改善に帰着するわけではない。このため、酸素供給を補うことが蘇生術の主要な目的で

あるなら、酸素供給、酸素消費量と局所組織アシドーシスのモニターが最も重要である。組織アシドーシスは乳酸と塩基欠乏が血清指標となるが、組織酸素化を直接測定するための処置は非常に侵襲が大きい。従来、組織酸素のモニターには、近赤外分光法、ポーラログラフの電極挿入、あるいは他の侵襲技術などが用いられてきた。近赤外分光法は容易で非侵襲性であるが、頸静脈酸素飽和度の標準技術との相互関係の欠如が指摘されている。また、近赤外分光法はヘモグロビン、オキシ・ヘモグロビン、およびチトクローム酸化酵素の吸収スペクトルの相違に基づくため、この技術が酸素代謝やHBOCsの評価にどのように役立つかわからない。これらの技術で計測される信号の変化は、組織の特有の機能状態には関連しないことがわかっている。

Hb小胞体を開発しているグループは、Hb小胞体が末梢組織の酸素欠乏を回復させることを間接的測定法により示している。本研究では、HBOCsによる蘇生術の機能評価のためにPETを利用すれば、視覚的、定量的、非侵襲的に生存動物での酸素供給と代謝を評価できることを実証する。CMRO₂は、脳血流量（CBF）、OERとCaO₂より求められる。膜中の酸素輸送は受動的な拡散に従うので、細胞内酸素分圧（PicO₂）はCaO₂に直接関連する脳酸素分圧（PbrO₂）によって変動する。PbrO₂は35mmHgの正常レベルから、出血性ショックの後に15 - 20mmHgの臨界水準以下まで減少する可能性がある。軽度の失血において、PbrO₂は脳の自己調節によって臨界水準以上に維持される。酸素をミトコンドリアに届ける拡散力が重篤な出血で大幅に低下するため、自己調節はMAPが60-150mmHgの範囲内だけで役立つ。微小血管系からの酸素拡散距離も出血による組織浮腫と損傷のため増加する。拡散係数と脳自己調節の変化により、CaO₂またはPbrO₂のどちらかを除外した評価は十分でないかもしれず、脳酸素代謝とエネルギー代謝に関する付加的な情報が必要である。CaO₂の増大がPbrO₂の増加に必ずしも帰着するわけではなく、より高いPbrO₂がより高いPicO₂を意味するわけでない。CMRO₂が可逆性そして不可逆性脳障害の信頼性の高い予測因子である。基礎レベルの61-69%以下への酸素代謝の低下は危機的とみなされる。このように、CMRO₂を変数とするPETイメージから得られる情報は、脳障害の可逆性の予測に有用かもしれない。

著者らは、LEHの酸素供給能を調査するために¹⁵O-PETイメージングを適用し、脳血流量と容量を測定しなくてもCMRO₂を正確に評価できるOhtaの単純化された二相モデルでデータを解析した。この手順は動脈入力関数（AIF）を導くために心動脈スペースを使ってさらに簡便になった（詳細は原文付録A参照）。CMRO₂の改善において、LEHは酸素運搬能力を持たない輸液に比較して有意に良好な成績を示した。しかしながら、全血はCMRO₂をbaselineレベルまで回復させ、最も効果的な輸液であった。ただし、LEHのHb含量が返血した脱血液の半分に相当する点に留意する必要がある。LEHの大きさ（193.5 nm）は分子状修飾Hbに比較して大きい、赤血球と比較すれば非常に小さい。小粒径のLEHは赤血球と比較して血管内で均一に

分布するため、LEHのHb含有量と関連する酸素供給を助長することが考えられる。等価性の立証には、LEHと血液のHb濃度を合せて更なる検討が必要である。

心血管レベルの容量損失の補正が細胞酸素代謝の回復を必ずしも意味するわけでない。HSAとLEHはそれらの膠質浸透圧によって有意にMAPを改善したが、CMRO₂を有意に増大させたのはLEHだけであった。HSAには酸素運搬能がなく、さらに血管内で静水圧の平衡を保つために間隙水を引込むことでヘマトクリットを低下させる傾向がある。一方、生理食塩水にはそのような血液希釈の傾向がない。急性失血において、生理食塩水の輸注は浮腫を誘発する。これは、膠質浸透圧のない輸液が静水圧に従って細胞外間隙に漏れることに起因する。今回のLEHは5%HSAによって等張で、組織への酸素の受動拡散のための推進力である動脈PO₂を増大できる。HSAとLEHで蘇生術に対する循環予備能の適切な評価には、脳血流量と脳血液量の評価を含むより詳細な検討が必要である。

要約すると、LEHによる蘇生術が効率的に酸素を低酸素の脳組織に運搬することでCMRO₂を改善できることを実証した。LEHと血液のHb含量を合せてLEHの性能を全血蘇生と比較すれば、より興味深い結果となるであろう。重要臓器での生理的な代謝速度を定量化する¹⁵O-PET特有の能力を人工酸素運搬体の評価に初めて適応した。この新しいPET技術は、臨床治験のさまざまなステージにある各種Hb由来酸素運搬体の評価法として広く活用できる。PETの有用性は、酸素代謝の評価に限られるものでない。PETによる酸素代謝の研究は、HBOCsがショック状態を改善する機構の区別を可能にするかもしれない。例えば、Oxyglobinのような分子状修飾Hbは、酸素を輸送するだけでなく血管内の膠質浸透圧を増加させる。現時点では、HBOCsの酸素運搬あるいは膠質浸透圧がショック状態の改善に関与するかどうかかわかっていない。遊離Hbの急速な酸化はHBOCsの酸素運搬能を低下させるが、その膠質浸透圧の大部分はまだ保持されている。分子状修飾Hbの投与後初期の効果には酸素運搬と膠質浸透圧の両方による可能性があり、時間の経過により膠質浸透圧の効果が優勢となるであろう。循環量、酸素運搬能、およびCMRO₂の改善を同時に測定すれば、HBOCsの作用機序の詳細が明らかになる可能性がある。

参考文献

1. Djordjevic L, Miller IF. Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. *Fed Proc* 1977;36:567-571.
2. Rudolph AS, Klipper RW, Goins B, Phillips WT. *In vivo* biodistribution of a radiolabeled blood substitute: ^{99m}Tc-labeled liposome-encapsulated hemoglobin in an anesthetized rabbit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10976-10980.
3. Szebeni J, Wassef NM, Spielberg H, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochem*

- Biophys Res Commun 1994;205:255-263.
4. Goins B, Phillips WT, Klipper R, Rudolph AS. Role of complement in rats injected with liposome-encapsulated hemoglobin. *J Surg Res* 1997;68:99-105.
 5. Loughrey HC, Bally MB, Reinish LM, Cullis PR. The binding of phosphatidylglycerol liposomes to rat platelets is mediated by complement. *Thromb Haemost* 1990;64:172-176.
 6. Phillips WT, Klipper RW, Awasthi VD, Rudolph AS, Cliff R, Kwasiborski V, Goins BA. Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:665-670.
 7. 土田英俊, 酒井宏水, 武岡真司, 宗 慶太郎, 小林紘一. 酸素輸液 (人工赤血球). *医学のあゆみ* 2003;205:558-566.
 8. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated Hb using organic solvent and heat treatment. *Protein Expression Purif* 1993;4:563-569.
 9. 武岡真司. 分子集合科学を利用した人工血液の創製. *人工血液* 2005;13:136-147.
 10. Sakai H, Tomiyama K, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjugate Chem* 2000;11:425-32.
 11. Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:702-709.
 12. Phillips WT, Lemen L, Goins B, Rudolph AS, Klipper R, Fresne D, Jerabek PA, Emch ME, Martin C, Fox PT, McMahan CA. Use of oxygen-15 to measure oxygen-carrying capacity of blood substitutes in vivo. *Am J Physiol* 1997;272:H2492-H2499.
 13. Cabrales P, Sakai H, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Oxygen transport by low and normal oxygen affinity hemoglobin vesicles in extreme hemodilution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1885-92.
 14. Plock JA, Tromp AE, Contaldo C, Spanholtz T, Sinovic D, Sakai H, Tsuchida E, Leunig M, Banic A, Erni D. Hemoglobin vesicles reduce hypoxia-related inflammation in critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med* 2007;35:899-905.
 15. Yamamoto M, Izumi Y, Horinouchi H, Teramura Y, Sakai H, Kohno M, Watanabe M, Kawamura M, Adachi T, Ikeda E, Takeoka S, Tsuchida E, Kobayashi K. Systemic administration of hemoglobin vesicle elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J Surg Res* 2008 (in press).

Call for Papers

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

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

kita@kenkousya.jp



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

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

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

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

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

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

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

ii) Submission by post of four sets of hardcopies.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12) References should be cited numerically in order of appearance in the text using superscript letters as follows: ²⁾, ^{3,5)}, ^{1,4,6)}, etc. References should be listed using the Vancouver style as follows: Names of all authors. Title of paper. Title of journal. Year of publication; volume number: inclusive page numbers. Abbreviations of journal names should be in accordance with *Index Medicus*. References to books should be given as follows: Names of all authors. Title of paper. Name of editor(s). Book title. Place of publication: Publisher, year; inclusive page numbers.

References to electronic sources should be given as follows: Name of website.

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

Examples:

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

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

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

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

16) Address for manuscripts to be sent:
Attn: Hiromi Sakai (Editor-in-Chief)
Artificial Blood Editorial Office
The Society of Blood Substitutes, Japan
Oxygen Infusion Project
Bldg. #55S, Rm. 703
Research Institute for Science and Engineering
Waseda University
3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

Tel: +81-3-5286-3122 Fax: +81-3-3205-4740
E-mail: kita@kenkousya.jp

投稿規定（平成20年9月30日改訂）

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

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

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

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

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

ii) ハードコピー4部を郵送する。

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

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

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

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

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

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

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

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

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

9) 句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする。

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

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

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

13) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では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。電子文献の場合は、ホームページ名。改行してアドレス（引用した西暦年月）とする。

(例)

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

14) 既発表の図表, その他を引用, 転載する場合には, あらかじめ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.

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

- a) すでに掲載された論文であること.
- b) 著者は両方の雑誌の編集者より許可を得ていること. 二次掲載する編集者に最初に掲載されたもののコピー, 別刷, もしくは原稿のいずれかを添付すること.

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

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

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

17) 掲載料. 掲載料は無料とし, 論説, 総説, 原著, 報告等については別刷り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.

18) 原稿の送付先

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1
早稲田大学理工学研究所 55号館S棟703室
酸素輸液プロジェクト内
日本血液代替物学会 会誌「人工血液」
編集部
酒井 宏水 宛

電話: 03-5286-3122, FAX: 03-3205-4740
E-mail: kita@kenkousya.jp

●編集後記●

大谷 編集委員の「はじめに」によりますと、遺伝子組換えアルブミンの研究が日本で開始されたのが1981年。何と27年も前とのことです。本号では、遺伝子組換えアルブミン製剤が世界に先駆けて日本で認可されたことを記念して、特別座談会を行った模様を掲載しました。本文に記されておりますように、この企画は宮尾 先生が編集委員長であった時から計画されていたものです。今春の認可を受け、漸く実現しました。当時の臨床試験の責任者としてご活躍された太田 宗夫 先生をお招きし、貴重な御意見をお聞きすることができました。ここ暫くはアレルギー反応の問題を継続して注視しなければならないとの意外な実情を知りましたが、ヒト血液由来の感染の可能性を回避できることは大きな利点です。新しい医薬品として臨床現場で様々な貢献が期待されます。遺伝子組換えアルブミン製剤の開発に携わった多くの研究者に敬意を表します。また、札幌医大の松永 卓也 先生からは、臍帯血由来造血幹細胞からの赤血球と血小板の大量培養について最前線のお話を頂きました。人工赤血球、人工血小板には、生体高分子と合成物等の複合体から構築するアプローチと、造血幹細胞から増殖するアプローチが存在します。それぞれに利点・欠点があると考えられますが、実現に向け今後の進展が期待されます。

今から12年前、本誌第4巻4号(1996年)に(故)関口 定美 先生が、平成7年度 厚生科学血液研究事業「代替血液製剤に関する研究」について紹介をしています。関口 先生統括のもと、研究課題には、人工赤血球、人工血小板、造血幹細胞、遺伝子組換え凝固因子のほか、遺伝子組換えアルブミンのガイドライン、また造血関連サイトカイン(札幌医大の新津 洋司郎 先生の担当)がありました。日本における人工血液の個々の研究が国策として継続され、着実に成果を生んでいることを、本

号の内容からも実感させられます。

本誌第16巻1号(2008年)では、FDA主催のワークショップ(2008年4月開催)のことを紹介致しました。NatansonらのJAMA誌掲載の論文(Cell-free HBOCsの臨床試験のメタアナリシスから、HBOCs投与群は死亡率が高く、また心筋梗塞の発症率が高くなるという驚きの内容)について議論されました。HBOCsの研究開発は節目を迎えたのかかもしれません。しかし、その後JAMA誌には、これに反論する読者からの投書が幾つも掲載されております。安全性が重要である事は言う迄ありませんが、輸血が出来ない状況で、HBOCsはUnmet Medical Needsを満たすことが期待されます。HBOCsの意義は明白で、研究開発は継続されるべきであり、単に生理食塩水や輸血との比較ではなく、効力を最大限発揮できる状況での臨床試験が必要なのかかもしれません。また、Cell-free HBOCsの根本的な問題解決のためには、Cellular HBOCsが否応なく注目されます。宗 慶太郎 先生が、テキサス大学サンアントニオ校で開発されているCellularタイプのLiposome encapsulated Hb (LEH) について紹介を頂きましたように、Made in JapanのCellular HBOCsの性能が格段に高いと考えられます。10月末に開催された第6回Current Issue on Blood Substitutes Research (CIBSR) でも、日本で開発されてきた物質系がアピールされたと思います。2009年の国際血液代替物学会(12th-ISBS)がバルマ(イタリア)で、2010年には米国で7th-CIBSR、2011年には同じく米国で13th-ISBSが開催されることがごく最近、決定されました。そのときまでには、一つ二つのHBOCsが実現しているのでしょうか。Cellular HBOCsはどこまで進んでいるのでしょうか。

(酒井 宏水)

編集委員会

●酒井 宏水(委員長)、東 寛、大谷 渡、武岡 真司、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.16 (3) 2008年11月7日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

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

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 55号館S棟703号室

早稲田大学 理工学研究所 酸素輸液プロジェクト

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

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

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