

人工血液

第 19 卷 第 1 号 2011 年 8 月

目 次

会告		2
原著	細胞型人工酸素運搬体の治験, 第 1 相計画高折 益彦	3
総説	肝臓病治療におけるアルブミン鈴木 壹知 他	12
	トランスフェリン修飾リポソームによる 細胞内送達とがん治療への応用平田 圭一 他	17
	オーバーハウザーMRIを用いた生体レドックス疾患の可視化兵藤 文紀 他	25

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 19 No. 1 August, 2011

Contents

<i>Announcement</i>		2
<i>Original Article :</i>		
	<i>Design of clinical trial (phase 1) for cellular artificial oxygen carrier</i>Masuhiko Takaori	3
<i>Review: Albumin and medical examination and treatment</i>		
	<i>of the liver disease</i>Kazutomo Suzuki, et al.	12
	<i>Intracellular targeting delivery of transferrin-PEG-liposomes</i> <i>to solid tumors</i>Keiichi Hirata, et al.	17
	<i>In vivo Molecular Imaging of Tissue Redox Status using</i> <i>Overhauser Magnetic Resonance Imaging</i>Fuminori Hyodo, et al.	25

会 告

第18回日本血液代替物学会年次大会

期 日：2011年10月27日（木）～28日（金）

会 場：北海道大学医学部学友会館フラテ（札幌市北区北15条西7丁目）

大会長：米川 元樹（特定医療法人北榆会 札幌北榆病院 理事長）

テーマ：「血液代替物実用化を促進させよう」

【特別講演】指定

- ・ iPS細胞から血小板を作る（仮題）
- ・ 酸素はわれわれに善玉か悪玉か（仮題）
- ・ 血液代替物の歴史と現状（仮題）

【教育講演】指定

- ・ 臨床治験について（仮題）
- ・ リポソームの組成とその組織親和性（仮題）

【シンポジウム】公募（一部指定）

- ・ 人工酸素運搬体の実用化を促進するためには
- ・ 虚血灌流障害と酸素運搬体

【一般演題】公募

演題募集締め切り：平成23年8月18日（木）

※演題募集はホームページで行います。

下記URLをご参照ください。

<http://sbsj2011.jp/>

大会事務局：〒003-0006 札幌市白石区東札幌6条6丁目5-1

特定医療法人北榆会 札幌北榆病院

TEL：011-865-0111（内線2571） FAX：011-863-5553

E-mail：sbsj2011@hokuyu-aoth.org

（担当：津島）

細胞型人工酸素運搬体の治験，第1相計画

Design of clinical trial (phase 1) for cellular artificial oxygen carrier

高折 益彦

Masuhiko Takaori

Abstract

We presented our protocol for the phase-1 clinical trial in this paper and appreciated to be given some criticisms by readers. This trial is separated into the first and second step. In the first step, it is scheduled that an artificial oxygen carrier, liposome encapsulated hemoglobin suspended in the physiological saline (HbV), of 10ml, 50ml, 100ml, and 200ml will be infused into 2 volunteers for each, respectively. In 400 E group of 6 volunteers, it is scheduled that 400ml of volunteer's own blood will be withdrawn and then HbV of 400ml will be infused immediately. The blood will be stored at 4℃ and be transfused to the volunteer, if necessary. In the second step, 6 volunteers will be provided for 600 EG and 800 EG trial for each. In the 600 EG, blood exchange with HbV and HES (hydroxyethyl starch : 70×10^3 MW/0.55 DS) solution is scheduled as follows; Volunteer's own blood of 400ml will be withdrawn and HbV of 400ml and HES solution of 300ml will be infused. At 20 min. after the above blood/HbV · HES exchange, volunteer's own blood of 200ml will be withdrawn and HbV of 200ml and HES solution of 150ml will be infused. Blood/HbV · HES exchange in the 800 EG is scheduled as follows; Volunteer's blood of 400ml will be withdrawn and HbV of 400ml and HES of 300ml will be infused as same as done in the 600 EG. Then 20 min. later, the same blood/HbV · HES exchange will be repeated. These volunteer's blood withdrawn at the first blood/HbV · HES exchange will be stored at 4℃ in a refrigerator for one week and will be transfused into each donor according to doctor's decision, if necessary. Tests which are accorded to the adverse effect report regulated by Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare are scheduled to perform in this trial. And further tests on plasma ferritin level, lung functions (vital capacity, % FEV, arterial and central venous blood gas and pH), anaerobic metabolic parameters (plasma lactate, base excess), immunological tests (complement activities and antigen/antibody reaction) are added. Those tests will be performed before the HbV infusion, 20 min., 2 hr., 24 hr., and 7 days after the HbV infusion. This protocol is designed to minimize number of volunteers and to maintain their safety. Further it is designed to provide for the subsequent phase-2 of clinical trial according to the guideline by Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare.

Keywords

cellular artificial oxygen carrier, clinical trial, phase 1, hemodilution, single infusion, blood exchange, liposome encapsulated hemoglobin

1. 緒言

人工酸素運搬体，いわゆる人工赤血球の開発が試みられてからすでに半世紀になる¹⁻³⁾。そして人工酸素運搬体の候補となったものの中で，perfluorocarbonを酸素結合体として用いたものは種々の合併症^{4,5)}の発生から現在ではその開発が頓挫している。一方，ヘモグロビンを酸素結合体として開発された hemoglobin based oxygen carrier (HBOC : HemopureTM [Biopure]) は南

アフリカ共和国で鎌形赤血球症や，強度の急性貧血治療での使用が認められている⁶⁾。しかし同じ製品についてもアメリカ合衆国では家畜を対象とした使用にのみ限られていて，ヒトを対象とした臨床での使用は認められていない。わが国においては Chang¹⁾，Djordjevich⁷⁾ らによって始められた cellular HBOC, liposome encapsulated hemoglobin vesicle (HbV) の開発が進められた。そしてすでに20数年となり⁸⁾，現在，その前臨床試験

東宝塚さとう病院 〒665-0873 兵庫県宝塚市長尾町2番地1号 East Takarazuka Hospital, 2-1 Nagao, Takarazuka City, Hyogo, 665-0873 Japan

論文受付 2011年6月10日 論文受理 2011年7月5日

はほぼ完成した状態にある。またその製造に関するGMP (good manufacture practice) の完成も遠くない状態にある。したがって将来を見据えてHbVの臨床試験、第1相の施行体系をデザインするのは決して時期尚早とは思えない。これらの状況を踏まえここにHbVの臨床試験、第1相の施行計画を提示し、人工酸素運搬体の開発にたずさわる方々からのご批判を頂きたいと本稿を発表した。

2. 治験計画

対象治験薬であるHbVは一般治療薬と異なりその臨床使用量はヘモグロビン内包リボソーム量として少なくとも約200グラム(薬液量として約600ml)を必要とする。今回予定している治験は第1相治験であって治験薬の安全性に主眼がおかれる。そしてそれをさらに2段階に分割、第1段階においてはHbVに対する安全性を中心に、第2段階では第2相治験の施行も視野に入れて投与量増加にともなう生体反応を観察することを目的として計画した。

施行時期 : GMP承認時

施行施設 : 臨床試験、治験施行民間施設

実施方法

対象者 : 報道機関を介した募集に対して応募した20~60歳の健康成人男女(妊娠中、およびその可能性のある女性を除く)に本治験の目的、その医療・社会的意義、前臨床試験での安全性、有効性、治験施行場所・時期、手順、検査項目、治験薬投与方法、その他の治験操作、それにともなう保証、ならびに手当てなどを記載した説明書、治験参加への同意を口頭ならびに文書として説明する。そして治験への参加の同意を得た応募者に過去・現在の病歴、健康状態、アレルギー等に関する問診、一般理学所見(身長>155cm、体重>50kg、血圧測定、胸部聴打診、腹部触診等)、胸部X線検査、心電図検査を施行する。そしてこれらの検査において一応治験適合と予測された治験対象者を選出、自宅待機を依頼する。次ぎにこれらの選出者について適宜、治験施設での検査を依頼し、呼吸機能検査(肺活量、1秒率)、肝機能検査(総蛋白、アルブミン、総コレステロール、遊離脂肪酸、ビリルビン、sGPT、sGOT、 γ GPT、LDH、アルカリホスファターゼ、尿酸、血糖、プロトロンビン値、血漿リパーゼ値)、腎機能(尿色調・量・比重・沈渣、尿糖、BUN、creatinine、ウロビリノゲン)、血液一般(Hb値、Ht値、赤血球数、白血球数・分類、血小板数、PT、aPTT)、血清電解質(Na、K、Cl)、免疫機能検査(補体活性)を追加検査する。治験対象者はこれらの検査後帰宅し、再び自宅待機する。治験当局はこれらの検査、すなわち選択検査の結果について検討し治験適任者を選出する。そして治験対象者と選出された被験者を第1段階治験群、第2段階治験群に無作為的に割り当て、それぞれの被験者に治験施行予定日を通知して以下の治験へと移行する。なお治験実施日は選別検査日から 9 ± 2 日とする。

A. 第1段階治験

上記の対象者の中、14名を第1段階治験対象者として以下の5群に区分する。

1) 10ml 群 (10SG※) 2名

※SG: single HbV infusion group

2) 50ml 群 (50SG) 2名

3) 100ml 群 (100SG) 2名

4) 200ml 群 (200SG) 2名

3) 400mlE群 (400EG※) 6名

※EG: blood/HbV exchange group

これら5群への治験施行は10SG、50SG 400EGの順に施行し、10SGにおいて予測せざる不祥事象(adverse effect)が発生しないことを確認後に50SGを施行、そして順次予測せざる不祥事象が発生しないことを確認して最終的に400mlEGを施行する。

対象被験者は治験前日に施設に赴き、一般理学的検査を受け、施設内での安静、食事、睡眠をとる。治験薬投与当日には所定の検査、治験薬の投与を受け、施設内での安静、食事、睡眠をとる。治験薬投与後1日目には所定の検査を受け、身体的に異常がないことを確認して帰宅する。さらに治験薬投与7日後に施設に赴き所定の検査を受ける。そして異常がないことを確認して治験を終わる。

検査: 治験前日検査、治験薬投与前検査、治験薬投与2時間後検査、治験薬投与24時間後検査、治験薬投与7日後検査

検査項目:

治験前日検査は一般理学的検査にて健康状態に異常がないことの確認に留める。

治験当日、およびそれ以後の検査項目は以下のごとくである。

(1) 一般理学的検査

(2) 循環器機能(血圧、脈拍数、12誘導心電図、CPK-M)

(3) 呼吸機能検査(胸部X線、肺活量、1秒率、PaO₂、PaCO₂、pHa)

(4) 肝機能検査(総蛋白、アルブミン、総コレステロール、遊離脂肪酸、ビリルビン、sGPT、sGOT、 γ GPT、LDH、アルカリホスファターゼ、尿酸、血糖、プロトロンビン値、血漿リパーゼ値、血漿乳酸値)

(5) 腎機能(尿色調・量・比重・沈渣、尿糖、BUN、creatinine、ウロビリノゲン)

(6) 血液一般(Hb値、Ht値、HbVcrit※、白血球数・分類、血小板数、PT、aPTT、FDP) ※単位血液量中のHbVリボソーム粒子量(%)

(7) 血清電解質(Na、K、Cl)

(8) 免疫機能検査(補体活性、血清HbV抗原/抗体反応)

(9) 神経・運動検査(歩行、握力、腱反射、眼球運動、知覚機能、視力、聴力)

(10) 消化機能(食欲、腹部自覚症状、便所見)

なお被験者からの血液採取量は1回当たり15~17ml、治験当日検査から、治験薬投与1週間後の検査用血液を含めて総量

100ml 以下を目標とする。

治験薬投与

I. 10SG 治験

- 1) 被験者は治験前日午後に治験施設に赴き、一般理学的検査にて健康状態に異常がないことを確認、過激な運動を避け同施設にとどまり、治験施設より提供される食事を摂り、その夜は施設に泊まる (Fig.1)。
- 2) 治験薬投与当日の朝食は絶食とし一般問診にて健康感に異常がないことを確認する。
- 3) 上記 (1) ~ (10) の検査を受ける。
- 4) 診察台上にて仰臥位をとり、静脈確保を行ない 5 %ブドウ糖加乳酸リンゲル液 0.5 ml/kg/min の点滴を 20 分間受ける。
- 5) 上記静脈路の側管に HbV 製品点滴回路を接続、20 分で 10 ml 量の輸注を受ける。この時点で 5 %ブドウ糖加乳酸リンゲル液を生理食塩液に変更して 0.2 ml/kg/min の点滴を受ける。
- 6) 20 分後に上記 (1) ~ (10) の検査を受ける。この際 HbV 注入前に施行した検査に加えて血液中 HbV 濃度 (HbVcrit) 測定用の採血 (2 ml) を受ける。この血液は測定所定機関に送付する。
- 7) HbV 注入 2 時間後に HbV 注入 20 分後に施行した同一項目の検査を受ける。

この間、0.2 ml/kg/min の生理食塩液の点滴は持続される。

- 8) 検査後に異常ないことを確認して静脈路は抜去し、摂食、治験施設内にて安静を保ち、宿泊する。

- 9) 翌日、被験者は朝食を絶食とする。

- 10) 治験薬投与 24 時間後に上記 (1) ~ (10) の検査、ならびに HbVcrit 測定用採血を受け、自覚的、他覚的に異常を認めない場合は 2 時間の安静後、昼食を摂って帰宅する。

- 11) 被験者は一週後、治験施設に赴き、上記 (1) ~ (10) の検査、ならびに HbVcrit 測定用採血を受ける。

II. 50SG 治験

10 SG 治験を施行してその結果を解析して特に認めるべき合併症、副作用がなかった場合には 50 SG 治験に移行する。被験者は 10 SG 治験と同様に HbV 注入前日の検査を受け、施設内安静、食事、就眠をとる。また HbV 投与当日の朝食絶食、10 SG 治験施行時の HbV 注入前諸検査 [(1) ~ (10)] を受ける。また 10 SG 治験と同様の静脈確保、5 %ブドウ糖加乳酸リンゲル液の 0.2 ml/kg/min の速度の輸液を 20 分間受ける。次いで 20 分間で 50 ml の HbV を輸注を受ける。HbV 注入後の輸液 (生理食塩液)、検査を 10 SG 治験と同時間に受ける。また HbV 注入後の施設内での食事、宿泊も、10 SG 治験と同様に行なう。そして HbV 注入 24 時間後の検査、安静、摂食も 10 SG 治験同様に行なう。さらに被験者は一週後に治験施設に赴き、上記 (1) ~ (11) の検査、ならびに HbVcrit 測定用採血を 10 SG 治験と同様に受ける。

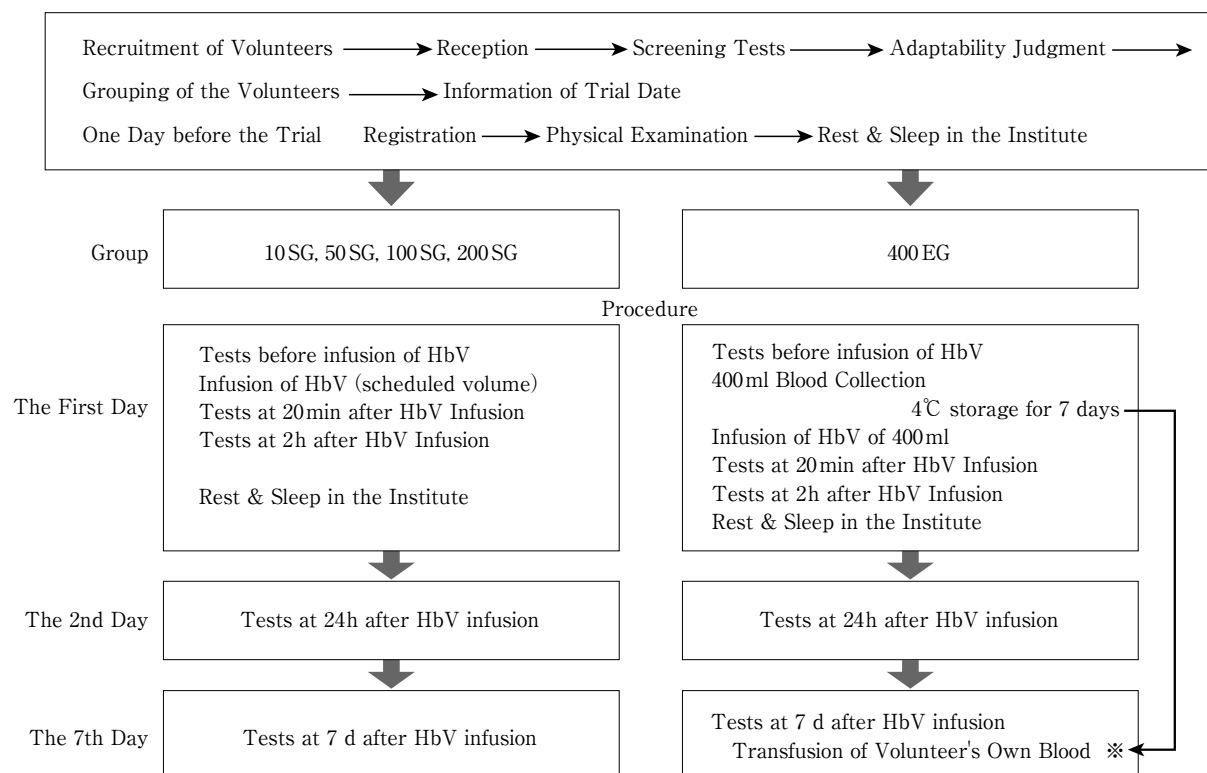


Fig.1. Diagram of the first step of trial. SG: single HbV infusion group. EG: blood/HbV exchange group. ※: According to institute doctor's decision

Ⅲ. 100SG 治験

50SG 治験を施行してその結果を解析して特に認めるべき合併症、副作用がなかった場合には100SG 治験に移行する。被験者は50SG 治験と同様にHbV 注入前日の検査を受け、施設内安静、食事、就眠をとる。またHbV 投与当日での朝食絶食、50SG 治験施行時でのHbV 注入前諸検査を受ける。また50SG 治験と同様の静脈確保、5%ブドウ糖加乳酸リンゲル液の0.2ml/kg/min の速度の輸液も受ける。次いで20分間で100ml のHbV を輸注を受ける。HbV 注入後の輸液、検査は50SG 治験と同様に受ける。またHbV 注入後の施設内での食事、宿泊も、50SG 治験と同様に行なう。そしてHbV 注入24時間後の検査、施設内安静も50SG 治験時と同様に行なう。さらに被験者は一週後に治験施設に赴き、上記(1)～(10)の検査、ならびにHbVcrit測定用採血を50SG 治験と同様に受ける。

Ⅳ. 200SG 治験

100SG 治験を施行してその結果を解析して特に認めるべき合併症、副作用がなかった場合には200SG 治験に移行する。被験者は100SG 治験と同様にHbV 注入前日の検査を受け、施設内安静、食事、就眠をとる。またHbV 投与当日での朝食絶食、HbV 注入前諸検査[(1)～(10)]を受ける。また100SG 治験と同様の静脈確保、5%ブドウ糖加乳酸リンゲル液の0.2ml/kg/min の速度の輸液を20分間受ける。次いで40分間で200ml のHbV を輸注を受ける。HbV 注入後の輸液、検査は100SG 治験と同様に受ける。またHbV 注入後の施設内での食事、安静、宿泊も、100SG 治験と同様に行なう。そしてHbV 注入24時間後の検査、施設内安静も100SG 治験施行時と同様に行なう。さらに被験者は一週後、治験施設に赴き、上記(1)～(11)の検査、ならびにHbVcrit測定用採血を100SG 治験と同様に受ける。

Ⅴ. 400EG 治験

200SG 治験を施行し、その結果を解析して特に認めるべき合併症、副作用がなかった場合には400EG 治験に移行する。被験者は前治験(10SG～200SG 治験)と同様にHbV 注入前日の検査を受け、施設内で安静を保ち宿泊する。またHbV 注入当日の朝食は絶食とし、HbV 注入前諸検査[(1)～(10)]を受ける。次ぎに静脈を確保し、5%ブドウ糖加乳酸リンゲル液の0.2ml/kg/min の速度の輸液も受ける。そして30分後に輸液剤を生理食塩液に替えてさらに同速度で20分間の輸液を受ける。次ぎに

- 1) 治験者から400mlの血液を採血バック(日本赤十字社使用、献血採血バック)に十分な無菌操作下にて採取する。採取した血液は1時間の室温放置の後に4℃の保冷庫に保存する。
- 2) 採血終了とともに静脈路側管からHbVの400mlを0.2ml/kg/minの速度で注入する。
- 3) 被験者はHbV 注入後の検査を前治験と同様に受ける。HbV 注入後の輸液、検査も前治験と同様に受ける。またHbV 注入後の施設内での食事、宿泊も前治験時と同様に行なう。そしてHbV 注入翌日の検査、生活も前治験と同様に

行なう。

- 4) さらに被験者は一週後に治験施設に赴き、上記(1)～(10)の検査を受ける。またHbVcrit測定用採血を受ける。
- 5) 採取・保管した被験者自己血は治験施設内に保管するが、1週間後に被験者が施設に赴いた際に特に輸血を必要とすること(2mg/dl以上のHb値の低下、被験者の倦怠・脱力感など医師による判定)が認められなかった場合には廃棄処分する。ただ輸血の必要性が認められた場合には被験者にそれぞれの自己血の必要量を10ml/minの速度で輸血する。
- 6) 検査、あるいは輸血後、医師の判断で被験者に異常が認められない場合には被験者は帰宅し、治験は終了する。

B. 第2段階治験

第1段階治験と同等の対象者、16名を以下の2群に区分する。

I. 600mlE群(600EG) 8名

II. 800mlE群(800EG) 8名

これら2群への治験施行は上記I, IIの順に施行し、600E群において予測せざる不祥事象(adverse effect)が発生しないことを確認後800E群の治験を施行する。

検査: 治験前日検査, 治験薬投与前, 治験薬投与後20分後検査, 2時間後検査, 24時間後検査, 治験薬投与7日後検査

治験操作, 検査項目:

I. 600mlE群(600EG)での検査・HbV 注入

被験者はHbV 投与前日に検査施設に入り、一般理学的検査を受け、健康状態に異常がないことの診断を医師より受ける。そして施設内にて安静を保ち、夕食を摂取し、就眠する。HbV 注入当日での朝食絶食などは第1段階治験と同様に行なう(Fig.2)。次に末梢静脈から中心静脈カテーテルを挿入する(輸液剤は生理食塩液とし、3ml/hで加圧注入)。そして以下の第2段階治験検査を行う。すなわち

- (1) 一般理学的検査
- (2) 循環器機能(血圧, 脈拍数, 12誘導心電図, CPK-M)
- (3) 呼吸機能検査(胸部X線, 肺活量, 1秒率, PaO₂, PaCO₂, pHa, 中心静脈PvO₂, Base Excess)
- (4) 肝機能検査(総蛋白, アルブミン, 総コレステロール, 遊離脂肪酸, ビリルビン, sGPT, sGOT, γ GPT, LDH, アルカリホスファターゼ, 尿酸, 血糖, プロトロンビン値, 中心静脈血乳酸値)
- (5) 腎機能(尿色調・量・比重・沈渣・糖), BUN, creatinine, ウロビリノゲン)
- (6) 血液一般(Hb値, Ht値, HbVcrit, 赤血球数, 白血球数・分類, PT, aPTT, FDP)
- (7) 血清電解質(Na, K, Cl)
- (8) 免疫機能検査(補体活性, 血清HbV抗原/抗体反応)
- (9) 神経・運動検査(歩行, 握力, 腱反射, 眼球運動, 知覚機能, 視力, 聴力)
- (10) 消化機能(食欲, 腹部自覚症状, 便所見)

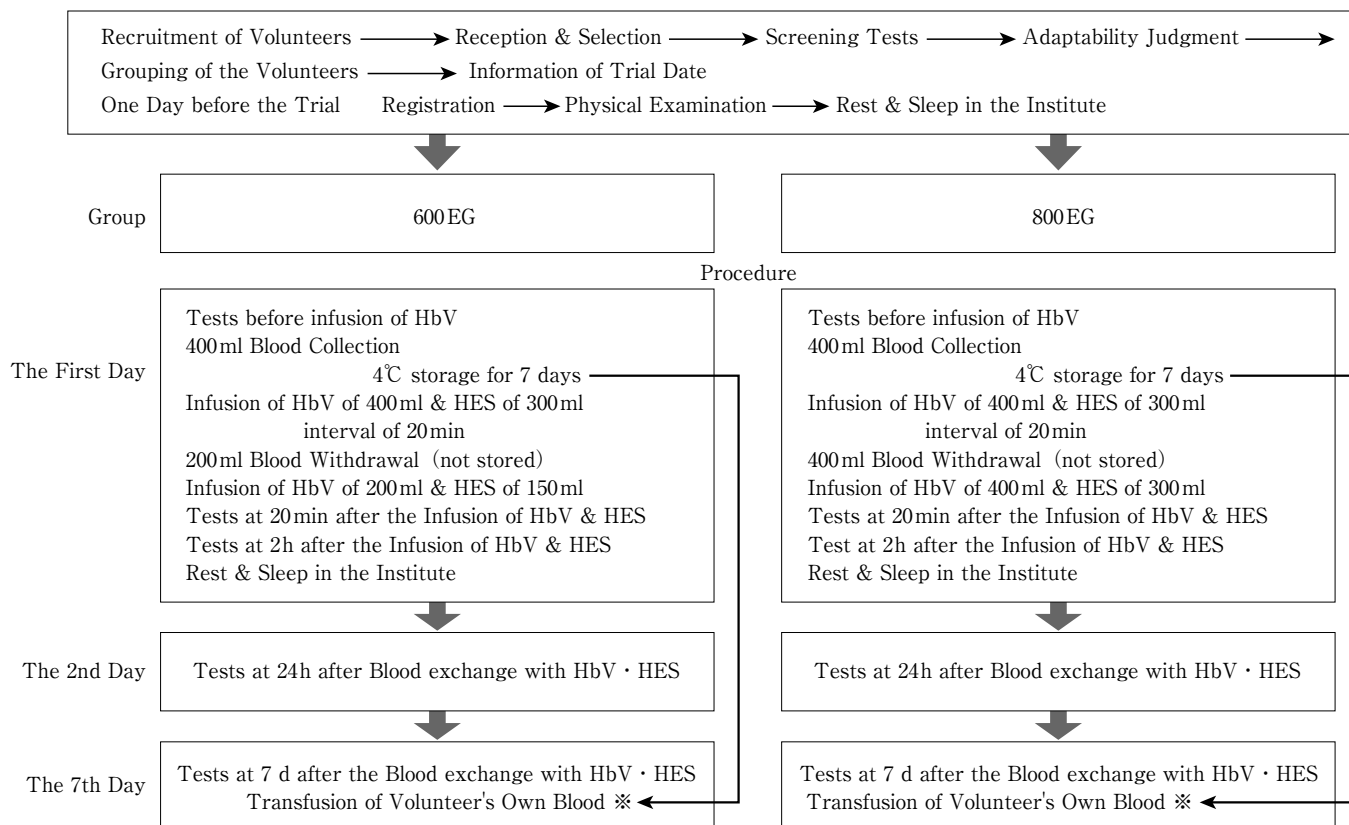


Fig.2. Diagram of the second step of trial. EG : blood/HbV exchange group. HES : 6% hydroxyethyl starch solution (Hespander™).
※ : According to institute doctor's decision

の検査を受ける。次ぎに静脈路を確保し、0.2ml/kgの速度で2.5%ブドウ糖加乳酸リンゲル液の輸液も受ける。そして30分後に輸液剤を生理食塩液に替えてさらに同速度で20分間の輸液を受ける。

- 1) 採血バック（日本赤十字社使用，献血採血バック）を使用して被験者から400mlの血液を十分な無菌操作下に採取する。採取した血液は1時間の室温放置の後に4℃の保冷庫に保存する。
- 2) 採血終了とともに静脈路側管からHbVの400mlを0.2ml/kg/minの速度で注入する。
- 3) HbV注入完了と同時に300mlのhydroxyethyl starch液（ヘスパンダー™）を0.2ml/kg/minの速度で静脈内に投与する。
- 4) 上記のHbV注入20分後に被験者の自覚的，他覚的所見に異常が認められないことを確認して被験者から200mlの採血を行う（この血液は廃棄処分する）。この採血終了と同時にHbVの200mlを0.2ml/kg/minの速度で注入する。
- 5) HbV注入完了と同時に150mlのhydroxyethyl starch液（HES，ヘスパンダー™）を0.2ml/kg/minの速度で静脈内に注入する。その後，静脈路は0.2ml/kg/minの速度の生理食塩液注入で維持する。
- 6) 被験者はHES注入20分後，2時間後の検査受け，静脈

路は抜去される。一方，中心静脈カテーテルはヘパリン充填で留置される。その後，被験者は施設内に留まり宿泊する。なおこの間，急性血液希釈に起因すると思われる症状が認められた場合には治験施設医師の判断で，確保されていた被験者の自己血を輸血し，治験は中止される。

- 7) 翌日，被験者は朝食を絶食し，HbV注入24時間後の検査を受ける。この間，中心静脈カテーテルは3ml/hの生理食塩液の注入にて維持する。そして2時間の観察後，異常を認めなかった場合には中心静脈カテーテルは抜去され帰宅する。
- 8) 被験者は一週後に治験施設に赴き，上記（1）～（10）[ただし中心静脈血について検査を除く]の検査，ならびにHbVcrit測定用採血を受ける。
- 9) 採取・保管した自己血400mlは1週間施設内に保管し，被験者が1週間後の検査が施行され，治験前のヘモグロビン値よりも2g/dl以上の低下が見られた場合，あるいは医師の判断にもとずき被験者自己血の輸血が必要と認められた場合にはその必要量を10ml/minの速度で被験者に輸血する。自己血の輸血の必要性が認められなかった場合，あるいは被験者の希望がなかった場合には保存した被験者自己血は廃棄処分される。

II. 800mlE群 (800EG) での採血・HbV注入

被験者は600mlE群と同様にHbV注入前日に治験施設に赴き検査を受け、施設内での安静、宿泊を行なう。HbV注入当日の朝食は絶食とし、600EGで施行したのと同じHbV注入前諸検査〔(1)～(10)〕を受ける。次に静脈路を確保し、2.5%ブドウ糖加乳酸リンゲル液の0.2ml/kg/minの速度の輸液を受ける。そして30分後に輸液剤を生理食塩液に替えてさらに同速度で20分間の輸液を受ける。

- 1) 被験者の400mlの血液を十分な無菌操作下に採血バック (日本赤十字社使用、献血採血バック) に採取する。採取した血液は1時間の室温放置の後に4℃の保冷庫に保存する。
- 2) 採血終了とともに静脈路側管からHbVの400mlを0.2ml/kg/minの速度で注入する。
- 3) HbV注入完了と同時に300mlのhydroxyethyl starch液 (HES, ヘスパンダーTM) を0.2ml/kg/minの速度で静脈内に注入する。
- 4) 上記のHbV, HES液注入20分後に被験者は自覚的、他覚的所見に異常が認められないことを確認されて、再度400mlの採血を受ける (この血液は廃棄処分する)。この採血終了と同時にHbVの400mlを0.2ml/kg/minの速度で注入する。
- 5) HbV注入完了と同時に300mlのhydroxyethyl starch液 (ヘスパンダーTM) を0.2ml/kg・minの速度で静脈内に注入する。その後、静脈路は0.2ml/kg/minの速度の生理食塩液注入で維持する。
- 6) 被験者はHES注入20分後、2時間後の検査受け、静脈路は抜去される。一方、中心静脈カテーテルはヘパリン充填で留置される。その後、被験者は施設内にて留まり宿泊する。なおこの間、急性血液希釈に起因すると思われる症状が認められた場合には治験施設医師の判断にて、確保されていた被験者の自己血を輸血し、治験は中止される。
- 7) 翌日に被験者は朝食を絶食し、HbV注入24時間後の検査を受ける。そしてこの間、中心静脈カテーテルは3ml/hの生理食塩液の注入にて維持される。2時間の観察で異常を認めなかった場合は中心静脈カテーテルは抜去され帰宅する。
- 8) 被験者は一週後に治験施設に赴き、上記(1)～(10) [ただし中心静脈血について検査を除く] の検査、ならびにHbVcrit測定用採血を受ける。
- 9) 採取・保管した自己血400mlは1週間施設内に保管し、被験者が1週間後の検査が施行され、治験前のヘモグロビン値よりも2g/dl以上の低下が見られた場合、あるいは医師の判断にもとずき被験者自己血の輸血が必要と認められた場合にはその必要量を10ml/minの速度で被験者に輸血する。なお自己血の輸血の必要性が認められなかった場合、あるいは被験者の希望がなかった場合には保存した被験者自己血は廃棄処分される。

3. 考察

1) HbV, hydroxyethyl starch注入量

Abeら⁹⁾、藤原ら¹⁰⁾の研究ではラットにおいてHbV注入に対する即時型アレルギー反応も遅延型のアレルギー反応も認められていない。また補体活性反応、免疫抑制反応も認められていない。しかしヒトを対象としたHbVの注入は本試験が最初である。そのため段階的に増量する方法をとり、安全性を確保するように計画した。とくに補体を介した反応では極めて少量の投与でも生体反応が現れる。そのため初めて投与する際の投与量を10ml, 2回目での投与量は50mlとした。

Sakaiらは¹¹⁾ ラットに20ml/kgのHbVを連続14日投与して動物が生存しうることを確認している。したがってヒトを対象とした本治験において成人を対象とした200mlのHbV単独注入はとくに循環血液量負荷とは考えられない。またSchnabelら¹²⁾ は僧帽弁疾患患者でも20ml/kgの膠質液注入に耐えうると報告している。しかしHbVの30%はヘモグロビンを内包した固形のリボソームであり血管壁を通過することがなく、膠質液よりも血管内滞留時間は延長される。その後リボソームは時間経過とともに肝臓、次いで脾臓に補足される¹³⁾。宗ら¹⁴⁾ によるとヒトにおけるHbVの血液中半減期は7日と推定されている。したがって循環血液量の10%以上の付加は避けるべきと考えてHbV単独投与量は200mlとした。そしてこの量を超えて投与する場合には血液交換を採用した。すなわち400mlの採血を行い、それに対応した量のHbVを輸注することとした。またその際採血した自己血は1週間後にHb値として2g/dlの低下があって、治験施設の医師の判断により、あるいは被験者の希望によっては返血することとした。

一方、厚生労働省の赤血球輸血施行の基準では成人で600mlの血液喪失があった場合となっている¹⁵⁾。したがって人工酸素運搬体であるHbVを赤血球輸血の代替として使用する適応は600ml以上の血液喪失があった場合となり、400mlでの投与基準では人工酸素運搬体として投与する価値が認められない。それゆえに本治験の第2段階施行は必要と考えた。ヘモグロビンを内包したリボソーム粒子は生理食塩液に浮遊された状態にあり、HbVcrit (ヘモグロビン内埋したリボソーム粒子体積のHbV全容量に対する比率) は30%と推定されている¹⁶⁾。上述のごとくHbV粒子の血管内半減期7日と予想されているが、溶媒である生理食塩液は注入後1時間以内にその約2/3が血管外に移行して¹⁷⁾ 血液量維持効果に乏しい。そのため400ml以上の血液交換においては生体が代償しうる限界の血液量を超える危険性がある。そのため膠質液 (hydroxyethyl starch液) を投与することが必要であると考えた。

一方、hydroxyethyl starch液などの人工膠質液を用いた血液希釈に関してはすでに自己血800～1200ml採取による希釈式自己血輸血が臨床において施行され、その安全性は確立されている^{18,19)}。膠質液としてのhydroxyethyl starch液 (ヘスパンダーTM) も、投与3～4時間でその70～80%が血管外に移行する²⁰⁾。しかし少なくともその20～30%は数時間血管内に留まる²¹⁾。さらにすでに脱血量と同等量のHbVが投与されている。そのた

め投与HES液は脱血量の3/4量とした。

2) 検査項目

酒井ら¹³⁾がラットでその循環血液量の50%とHbVとの血液交換を行ない2週間観察した際に血液中のコレステロール値に特徴的な上昇を認めた。この上昇は投与したHbVのリボソームが代謝され、あるいは遊離したものと推測された。またその機序は明かにされてはいないが血漿中リパーゼ値がHbV投与とともに上昇している。今回の治験においてはHbVの投与量は少ないものの同様な変化がみられるか血液中コレステロールを中心とした脂肪代謝の変化を観察することが重要と考えられ総コレステロール、遊離脂肪酸、 γ GPT、アルカリホスファターゼ、血漿リパーゼ値を厚生省薬務局通達項目²²⁾に加えた。

HbVと同様なりボソームを使用した人工酸素運搬体に関してPhillipsら²³⁾はラットでリボソーム膜が多重相となると血清中の補体を活性させることを報告している。また藤原ら¹⁰⁾も軽度ながらラットで同様な現象が見られることを報告している。したがって本治験においてはHbV投与にともない血清中の補体活性を観察するように計画した。そして補体活性にともなう生体反応として気管支平滑筋の反応を診るために肺活量、一秒率、血液ガス所見を検討するように計画した。さらにHbV投与にともないHbVに対して抗体産生がないか観察するためにHbV投与後1日目、7日目の血清について抗原/抗体反応を検査することを計画した。

頻回の輸血は生体内に鉄分子の蓄積を来しヘモクロマトーシスを来す²⁴⁾。そしてその際には血液中のフェリチン値が上昇することが認められている。HbVは生体に投与されて生体内の網内系に捕捉され、その後脾臓に転送され分解されて遊離の鉄分子が生じると推測される。一般に遊離された鉄分子は蛋白と結合してフェリチンとして血液中に放出される²⁵⁾。ただ頻回の輸血にともなう生体に付加される鉄分子の総量に比較すればHbVとして投与される鉄分子の量は少ない。しかしHbVの場合にはその分解速度が輸血された赤血球のそれよりは速やかである¹¹⁾。そのためHbVから鉄分子の遊離を観察するために血清フェリチンの測定は必要と考えた。

第2段階治験においては中心静脈カテーテルを挿入し、全身的な組織嫌気性代謝の指標としての中心静脈血のPvO₂、Base Excess、血漿乳酸値の測定を行なう。第1段階治験での400 EGでは日本赤十字血液センターが行なっている400ml献血量と同等量の血液とHbVとを交換するもので、それによる各臓器・組織への酸素供給面での安全性は保証されている。しかし第2段階治験での600 EG、800 EGではその保証が得られていない。しかし短時間での急性血液希釈に関しては十分量の膠質液を使用した希釈性自己血輸血での臨床成績^{18,19)}が示すごとく安全性は確認されている。今回の治験においては赤血球の代替役を果たすHbVは投与されてはいるが800 mlの血液交換後の血液希釈状態が1週間におよぶ。それ故にこの面での安全性の確認が必要と考えられた。またhydroxyethyl starch液の投与のみ行なうものを対照として検討すればHbVの酸素運搬機能面での優位

性が得られるかも知れない。しかしそのような対照群を設置することは倫理的な立場から好ましいとは思われない。ただ治験薬との血液交換24時間後の中心静脈血のPvO₂、Base Excess、血漿乳酸値の観察から1週間の推移が想定される。それによってもしなにかの全身的な組織嫌気性代謝が危惧されれば確保した自己血の輸血を行なうことも考えている。中心静脈血に関する測定を治験薬投与当日、その翌日にのみに限定するのは中心静脈カテーテル留置にともなう合併症を最小限に留めることを目的とした。そして所定の検査・測定が完了次第、中心静脈カテーテルを速やかに抜去して被験者の負担を少なくすることに努めた。

3) 被験者数と検査期間

健康成人被験者を対象とした治験第1相試験ではその結果を統計的に処理する十分な被験者を整えることも重要である。しかし倫理的観点から対象者を限定することも考慮しなければならない。第1段階治験での被験者数を10 SG、50 SG、100 SG、200 SGでは各群ともそれぞれ2名としている。HbVに対する反応性、とくにアレルギー、アナフィラキシー様反応がマウス²⁶⁾、ラット²⁷⁾、ビーグル犬²⁸⁾を使用したいずれの前臨床試験でも認められていない。またこれらの反応は治験薬投与量には関係なく²⁹⁾、もし反応が生じる場合には少量、たとえば皮内投与量でも顕れる。それ故に被験者数を少なくするためにも各群2名、計8名に留めた。一方、400 mlの治験薬を投与してそれが生体機能に及ぼす影響を検討するためには、統計的観察が最小限可能な6名の被験者を採用した。同様に第2段階治験でも各群6名を対象者とした。

検査・観察期間に関して選別検査からHbV投与当日までの期間を検査数値が著しく変化しない 9 ± 2 日と定め、被験者の負担を軽減するために努めた。さらに治験薬投与前後の施設内拘束期間も3日と最小限に留めた。

4. おわりに

わが国において、また外国においても人工酸素運搬体の臨床使用に課せられた社会的責務は赤血球輸血の代替をすることにある。したがって本稿において検討したHbVに関する第2段階治験はそれに即するように計画された。すでに述べたごとく、赤血球輸血のトリガー値は12 ml/kgの循環血液量の喪失とされている¹⁵⁾。それをもとに今後第2相治験、あるいは第3相治験において用いられるHbV量は成人を対象として少なくとも600～800 mlと想定される。そのためここに企画した第2段階治験では最大800 mlの使用量と設定した。

また冒頭にも述べたごとく、この第1相治験は安全性に重点をおかなければならない。そして第2相治験を円滑に施行することにも配慮すべきである。本計画では被験者の心身の負担を最小限にすることに注意した。すでに行われた前臨床試験の結果から推測してこの計画の実施での安全性は十分確保されているものと思われる。またHbV投与にともなう生体変化も確実に把握できるものと思われる。したがってGMPの完成とともに

一日も早く本実験が実施されることに期待する。そしてわが国が指導して進めてきた細胞型人工酸素運搬体の開発がわが国の医療に、そして世界の医療に貢献することを切望する。

謝辞

本稿の作製には日本赤十字北海道血液センター藤原満博先生、早稲田大学理工学部酒井宏水先生、慶應大学医学部堀之内宏久先生から貴重な資料、助言を頂いたことに感謝する。また厚生労働省支援政策創薬総合研究事業“人工赤血球の臨床応用を目指した指摘投与法の策定とGMP製造技術の確立（H21-政策創薬－一般－006）”の研究補助金の支援を受けたことに感謝する。

参考文献

1. Chang TMS. Hemoglobin corpuscles. Report of a research project of B. Sc. Honours Physiology, McGill University Medical Library 1957.
2. 箕島 高. 人工血液. 東京：医学書院, 1968.
3. 関口 弥, 豊田忠之, 堀 原一, 木本誠二. 人工血液の可能性. 診療と保険 1969; 10: 35-39.
4. Spahn DR, van Breet R, Theileier G, Reibold JP, Welte M, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K. Perflubron emulsion delays blood transfusion in orthopedic surgery. Anesthesiology 1999; 91: 1195-1208.
5. Noveck RJ, Shannon EJ, Leese PT, Shorr JS, Flaim KE, Keipert PE, Woods CM. Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion II. Effects on immune function in healthy volunteers. Anesth Analg 2000; 91: 812-822.
6. Levien LJ, Hodgson RE, James MFM. Hemoglobin-base blood substitutes and risk of myocardial infarction and death (To the Editor). JAMA 2008; 300: 1295.
7. Djorjevich L, Miller IF. Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. Fed Proc 1977; 36: 567.
8. Tsuchida E, Takeoka S. Stabilized hemoglobin vesicles In: Tsuchida E ed. Artificial Red Cells-Materials, performances and clinical study as blood substitutes. John Wiley & Sons. Chichester 1995; 35-64.
9. Abe H, Azuma H, Yamaguchi M, Fujihara M, Ikeda H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E. Effects of hemoglobin vesicles, a liposome artificial oxygen carrier, on hematological responses, complement and anaphylactic reactions in rats. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2007; 35: 157-172.
10. 藤原満博, 東 寛, 池田久實. ヘモグロビン小胞体の in vitro におけるヒト血液細胞をよび血漿タンパクへの適合性. 人工血液 2009; 16: 212-220.
11. 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.
12. Schnabel TG Jr, Eliasch H, Thomasson B, Werko L. The effect of experimentally induced hypervolemia on cardiac function in normal subjects and patients with mitral stenosis. J Clin Invest 1959; 38: 117-137.
13. 酒井宏水, 堀之内宏久, 山本 学, 池田栄二, 武岡真司, 高折益彦, 土田英俊, 小林紘一. ヘモグロビン小胞体(HbV)-リコピナントアルブミン分散溶液による40%交換輸血：ラット脾臓内HbV代謝と造血に関する2週間の観察. 日輪学誌 2007; 53: 47-55.
14. Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red cell substitute. J Pharmacol Exp Ther 2005; 312: 702-709.
15. 厚生労働省医薬食品局血液対策課. 血液製剤の使用指針(改訂版). 薬食発第0906002号 平成17年9月6日 p.25-33.
16. Tsuchida E. Personal communication, Jan. 2010
17. 望月興弘, 古妻嘉一, 高折益彦. 細胞外液補給における低濃度デキストラン, 乳酸加リンゲル液の意義. 新薬と臨床 1970; 19: 115-120.
18. 黒木 透, 酒井資之, 高折益彦. Hemodilutional autologous blood transfusionに関する臨床的研究. 日輪学雑誌 1981; 27: 372-374.
19. 高折益彦. 血液希釈性拡大自己輸血. 医学のあゆみ 1984; 129: 1207.
20. 高折益彦. 代用血漿剤 HES：体内分布・排泄. 東京. 克誠堂出版 2010; 39-50.
21. 高折益彦. 代用血漿剤 HES：血漿量増量効果. 東京. 克誠堂出版 2010; 50-64.
22. 厚生省薬務局. 医薬品等の副作用の重症度分類基準について 薬安第80号. 厚生省薬務局安全課長通知 平成4年6月29日 (1992)
23. Phillips WT, Klipper R, Fresne D, Rudolph AA, Javors M, Goins B. Platelet reactivity with liposome-encapsulated hemoglobin in the rat. Exp Hematol 1997; 25: 1347-1356.
24. 原野昭雄. サラセミア. 血液病学. 三輪史郎, 青木延雄, 柴田昭 編集 第2版 文光堂 東京. 1995; 594-619.
25. Uchida T, Kariyone S. Kinetics of storage iron release. Acta Hematol Jpn 1978; 41: 1285-1292.
26. Shono S, Kinoshita M, Takase B, Nogami Y, Kaneda S, Ishihara M, Saito D, Kikucji M, Seki S. Intravenous transfusion with liposome-encapsulated hemoglobin improves mouse survival after hypohemoglobinemic shock without scavenging nitric oxide. Shock 2010; 35: 45-52.
27. Yamazaki M, Aeba R, Yozu R, Kobayashi K. Use of hemoglobin vesicles during cardiopulmonary bypass priming prevents neurocognitive decline in rats. Circulation 2006; 114: I-220-

- 225.
28. 堀之内宏久. 人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究 Beagle 犬を用いて 40%脱血ショックにおける Hb 小胞体の蘇生および中長期生存の評価. 厚生労働省科学研究費補助金 政策創薬総合研究事業 平成 18 年度～平成 20 年度 総合研究報告 書 研究代表者 小林紘一(平成 88-19 年度), 堀之内宏久(平成 20 年度) 慶應義塾大学 平成 21 (2009) 年 4 月 p6-9.
29. 渡辺富雄. 薬物性ショック. 日本医事新報 No.194 昭和 55 年 7 月 p1.

肝臓病治療におけるアルブミン

Albumin and medical examination and treatment of the liver disease

鈴木 竜知, 玉野 正也

Kazutomo Suzuki, Masaya Tamano

和文抄録

アルブミンは肝疾患診療においては重要な栄養指標であるだけでなく予後予測指標としても重要である。しかし、近年アルブミンに質的差異があることが指摘されるようになり、今後血清アルブミン値の測定には単に量的側面だけではなく質的側面についても考慮することが必要である。また、肝疾患、とくに肝硬変に合併した治療抵抗性の腹水や浮腫の治療にアルブミン製剤が用いられることが多いが、その際にも投与されるアルブミン製剤の質についても今後考慮することが必要である。著者らの検討では血清アルブミン値の測定方法としてはBCP改良法が最も優れた方法と考えている。また、アルブミン製剤としてはアルブミンの質的側面から国内製のアルブミン製剤が好ましいと考えられる。

Abstract

It has been shown that protein-energy malnutrition is an important prognostic factor in patients with chronic liver diseases. The serum albumin level is frequently used as an indicator of the protein nutrition status and prognosis. Human serum albumin is the mixture of human mercaptalbumin (HMA) and nonmercaptalbumin (HNA). Although the bromocresol purple (BCP) method provides high specificity in measurements of serum albumin levels, there was a reaction difference between the values for HMA and HNA measured by the BCP. The modified BCP method is superior method to evaluate the serum albumin levels in our study. Our study on human serum albumin preparations, domestic-made products and foreign-made products available in Japan, was conducted with regard to microheterogeneity of human albumin preparations. The ratio of HMA in domestic-made products was higher than the ratio of HMA in foreign-made products. In conclusion, domestic-made products was superior to foreign-made products in regard of microheterogeneity.

Keywords

Liver, ascites, Albumin, SH oxidized albumin, reduced albumin

1. はじめに

近年、栄養治療の重要性が認識されるようになり、臨床の現場において積極的に栄養治療が行われるようになってきた。

栄養治療を行う上で栄養状態を正確に評価し適切な栄養治療を行うことが重要である。血清アルブミン値は種々の栄養指標の中でも肝硬変患者の予後を予測できる簡便かつ重要な栄養指標であることから血清アルブミン値を参考に栄養治療が行われることが多い。しかしアルブミン測定の絶対的基準法はなく、免疫法が実用的基準法として、最も正確な測定方法と指摘されている。しかし、臨床の現場では日常一般法であるBromocresol green (BCG) 法が用いられている。アルブミン測定の意義は

肝硬変の合併症の腹水の成因の一つが低アルブミン血症であることであり、第二は肝硬変の予後を予測できることである。また低アルブミン血症に起因する腹水の治療として利尿剤やアルブミン製剤の投与が行われる。そこで本稿では血清アルブミン値の測定方法とアルブミン製剤について述べる。

2. 肝疾患とアルブミン

アルブミンは肝硬変の合併症の一つである腹水の原因の一つとして重要であるだけではなく肝硬変における重症度を判定する指標の一つとして重要である¹⁾。

アルブミンは肝臓で合成され、血清蛋白質の約59%を占め、

獨協医科大学越谷病院 消化器内科 〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50 Department of Gastroenterology & Hepatology, Koshigaya Hospital, Dokkyo Medical University 2-1-50, Minami-Koshigaya, Koshigaya, Saitama, Japan.

論文受付 2011年2月1日 論文受理 2011年3月10日

血漿膠質浸透圧の維持や生体代謝産物、薬物の運搬などの重要な役割を担っている。生体内におけるアルブミン代謝動態は血清アルブミン値により推定されるが、血清アルブミン値は肝細胞でのアルブミンの合成や分解、生体内分布状態により時々刻々変化し、合成されたアルブミンのほとんどは循環血中へと移行する。また血管内アルブミンプールと血管外アルブミンプールの移行が行われている。アルブミンの合成は種々の因子により調節されているが、慢性肝疾患においても以下に示すような様々な因子によって調節されている²⁾。

2-1. 肝血流

肝硬変では門脈域の線維化に伴い門脈の血流障害が生じることで肝細胞への栄養、酸素供給が障害される。すなわち門脈域から中心静脈へ向かう栄養、酸素供給路の障害が一因となって蛋白合成能が低下し、低アルブミン血症をまねく。

2-2. 栄養

アルブミンの合成はタンパク摂取量により変動し、18時間の絶食でアルブミン合成能は30～50%低下する。また、タンパク質の制限でもアルブミン合成能は約60%減少するが、アミノ酸を投与することにより6時間後には正常まで回復する。したがって肝血流障害と栄養摂取状況の変化により肝疾患ではアルブミンの合成能は低下すると考えられる。一方、アルブミンは1日に約4%が分解されているが、アルブミンの合成能が低下した状態ではアルブミンの分解を抑制し、血清アルブミン値を代償的に維持しようとする。その結果、アルブミンの半減期は延長し、アルブミンの質的变化が生じる。加藤ら³⁾はFig. 1に示すように肝硬変患者に分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）製剤を投与し、アルブミンの代謝動態を詳細に検討し、肝硬変ではアルブミンの合成低下のためアルブミンの分解が抑制されアルブミンの半減期が延長し、その結果アルブミンの血中濃度が維持されている。

分岐鎖アミノ酸を投与するとアルブミンの合成と分解が亢進し、アルブミンの半減期が短縮するが血中のアルブミン濃度には変化がみられないことから分岐鎖アミノ酸投与によりアルブミンの質的变化が生じた可能性を指摘し、分岐鎖アミノ酸投与

後にアルブミンの血中濃度には変化がみられないがアルブミンの血管外プールは有意に減少し、逆に血管内プールが有意に増加することを報告している。したがってこれによりアルブミンの質的な変化がアルブミンの体内分布に影響を与えることが明らかとなった。

したがって肝疾患においては体内のアルブミン代謝動態を血清アルブミン値で評価するに際してアルブミンの質的な面も考慮することが重要である。

3. 肝疾患診療における血清アルブミン値測定の意義

肝硬変患者においては低栄養状態が高率に合併し、蛋白・エネルギー栄養障害は肝硬変患者の予後に悪影響を及ぼすことが指摘されている⁴⁾。したがって蛋白・エネルギー栄養障害を早期に診断し栄養治療を行うことが重要である。蛋白栄養障害が合併すると低アルブミン血症や骨格筋の減少などの臨床検査値や身体所見の異常が出現する。Fig. 2に本邦で血清アルブミン値の測定方法として頻用されているBCG法による血清アルブミン値を示す。健康対照群に比較して慢性肝炎、肝硬変と病態の進行に伴い血清アルブミン値は有意に低下する。Fig. 3は血清

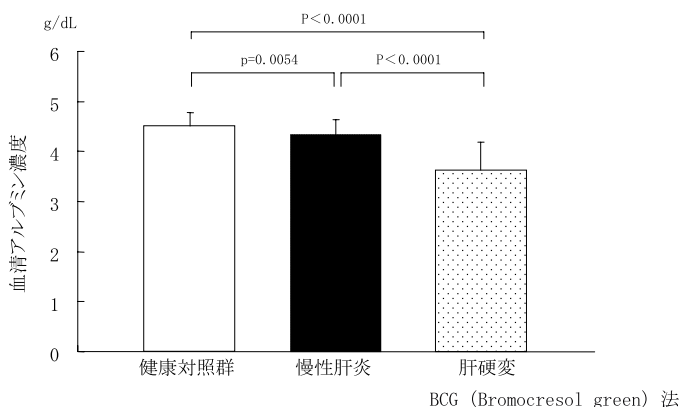


Fig. 2. 慢性肝疾患における血清アルブミン値 (自験例)

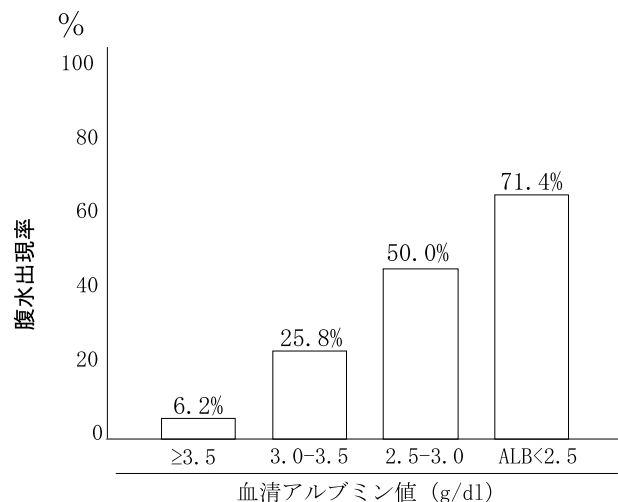


Fig. 3. 血清アルブミン値と腹水の出現率 (自験例)

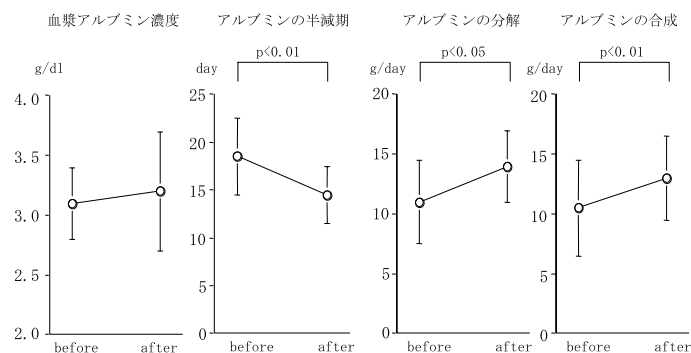


Fig. 1. 肝不全用栄養剤投与後のアルブミン動態³⁾

アルブミン値別に検討した腹水の出現率であるが、血清アルブミン値が低値となるほど血清膠質浸透圧が低下し、腹水の出現率が高率となる。肝硬変に合併する腹水の原因は低アルブミン血症だけではないが、その原因の一つとして低アルブミン血症は重要な要因の一つである。腹水は肝硬変患者10年の追跡で約50%に合併し⁵⁾、腹水が貯留すると2年間の間に50%の患者が死亡する⁶⁻⁸⁾ことが指摘されている。したがって肝硬変患者においては腹水の貯留を防止すること臨床的に重要であり、そのためには病態の進行防止と低アルブミン血症の出現を防止することが重要である。また、血清アルブミン値のみでも肝硬変患者の予後を予測することが可能であり、黒木ら⁹⁾はFig. 4に示すように経過観察時の血清アルブミン値を2群に分け、血清アルブミン値が3.5g/dL以上と3.5g/dL未満で明らかに予後が異なることを報告している。したがって肝疾患、とくに肝硬変の診療においては血清アルブミン値を測定することは重要である。

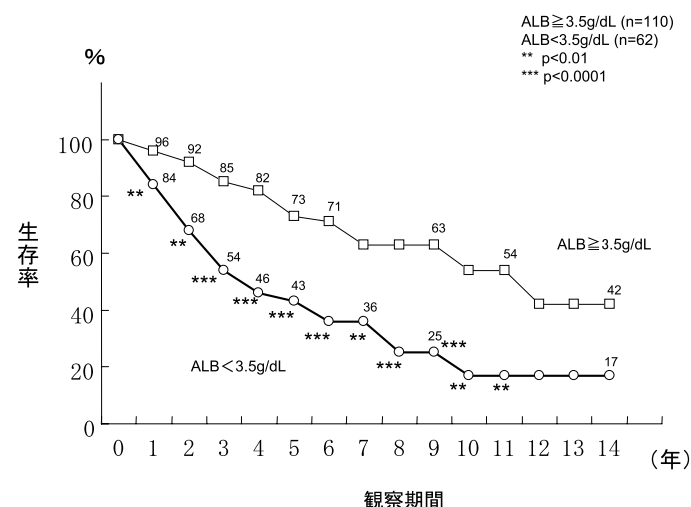


Fig. 4. 血清アルブミン値と肝硬変の予後⁹⁾
□：経過観察時の血清アルブミン値 (≥3.5g/dL) ○：経過観察時の血清アルブミン値 (<3.5g/dL)

4. 血清アルブミン値の測定方法と測定値

栄養治療を行う上で栄養評価が重要であることはBlackburn¹⁰⁾が「Nutritional assessment is the first step in the treatment of malnutrition」と述べている。すなわち適切な栄養評価が行われないと栄養治療が行われず、患者の予後は悪化する。肝硬変における栄養代謝異常としては蛋白栄養障害とエネルギー栄養障害があるが、約75%の肝硬変患者に蛋白栄養障害を合併している⁴⁾。したがって肝硬変の蛋白栄養障害を的確に評価するためにはアルブミンを量的だけではなく質的にも評価を行うことが重要である。Table 1に現在本邦で用いられているアルブミンの測定方法を示す。BCG法は本邦で最も頻用されている血清アルブミン値の測定方法であるが、アルブミン以外の蛋白質とも反応することが指摘されている。一方、BCP法 (Bromocresol

purple) はアルブミンに特異的な方法であるが、アルブミン分子内のSH (sulfhydryl) 基による呈色差異があることが指摘されている。肝硬変においてはヒトメルカプトアルブミン (HMA) + シスチン→ヒトノンメルカプトアルブミン (HNA) + システインの反応によりHMAが減少し、HNAが増加する。BCP法にはHNAの反応性よりHMAの反応性が高いことが指摘されている。以上から著者らはBCP法と村本ら¹¹⁾のBCP改良法の測定差はアルブミンのHNAの存在比率をある程度反映していると前提で検討を行った。内田らは¹²⁾ Fig. 5に現在の血清アルブミン値の測定方法として正確であるとされている実用基準法である免疫法と日常一般法であるBCG法とBCP改良法 (現在ではBCP法) による血清アルブミン値について多数例で詳細な検討を行い、BCG法もBCP改良法も免疫法と有意の正の相関を示したがBCG法は血清アルブミン値が低値例において高値を示す傾向がみられた。しかし日常一般法のBCP改良法はアルブミンが低値例においても免疫法と優れた相関を示しており実用基準法である免疫法に遜色のない測定方法であると指摘した。したがって、肝疾患においてアルブミン代謝状態を評価するために血清アルブミン値を測定するに際してはアルブミンの測定方法の特性を考慮することが重要であるが、現時点では著者らはBCP改良法が最も優れた方法であると考えている。

Table 1. 血清アルブミン値の測定法

測定方法	測定原理	特徴
Bromocresol green (BCG法)	メタクロマジー (蛋白誤差)	臨床の現場で広く用いられている方法 アルブミン以外の蛋白質と反応 自動分析装置で測定可能
Bromocresol purple (BCP法)	メタクロマジー (蛋白誤差)	アルブミンに特異的 アルブミン分子内のSH基による 呈色差異あり 自動分析装置で測定可能
改良型Bromocresol green法 (改良型BCP法)	BCP法の欠点であるHMAに比較してHNAの呈色率が高い点をDTNBとSDSを添加しHMAをHNAに転化してBCPに対する呈色率を一定にする	アルブミンに特異的 アルブミン分子内のSH基による 呈色差異なし 自動分析装置で測定可能
Nephelometry immunoassay (NIA法)	アルブミンと抗血清の不溶性複合体の散乱光線を測定する	血清の前希釈が必要 専用機器が必要 高価

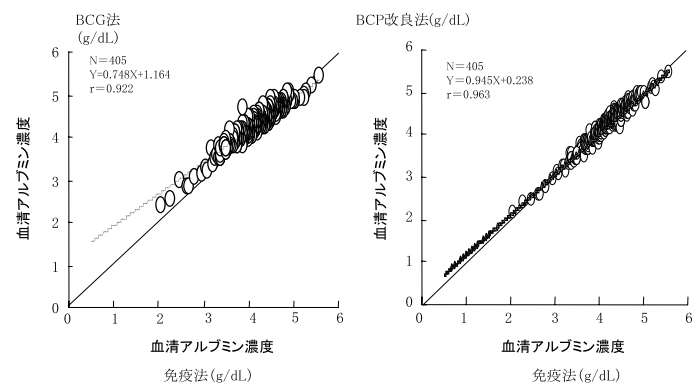


Fig. 5. 免疫法とBCG法, BCP改良法による血清アルブミン値¹²⁾

5. 肝硬変におけるアルブミンの質的变化

渡辺ら¹³⁾はFig. 6に示すように肝硬変において重症度が進行するにつれ血清アルブミン値は低下し、逆に酸化型アルブミンの増加することを指摘している。また福島ら¹⁴⁾は肝硬変患者に分岐鎖アミノ酸製剤を投与することにより酸化型アルブミンが有意に低下することを報告している。以上より肝硬変患者において酸化型アルブミンが増加し、分岐鎖アミノ酸製剤の投与により酸化型アルブミンが減少することが明らかにされ、肝硬変においては病態の変化や栄養状態の変化により酸化型アルブミン⇌還元型アルブミンの変化が流動的に行われていることが明らかとされた。著者らも分岐鎖アミノ酸製剤の投与前後でBCP法とBCP改良法による血清アルブミン値の測定値の差について

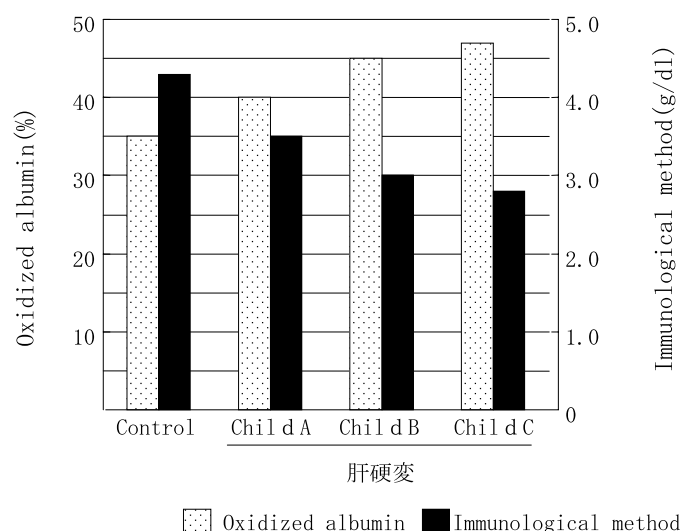


Fig. 6. 血清アルブミン値と酸化アルブミン¹³⁾

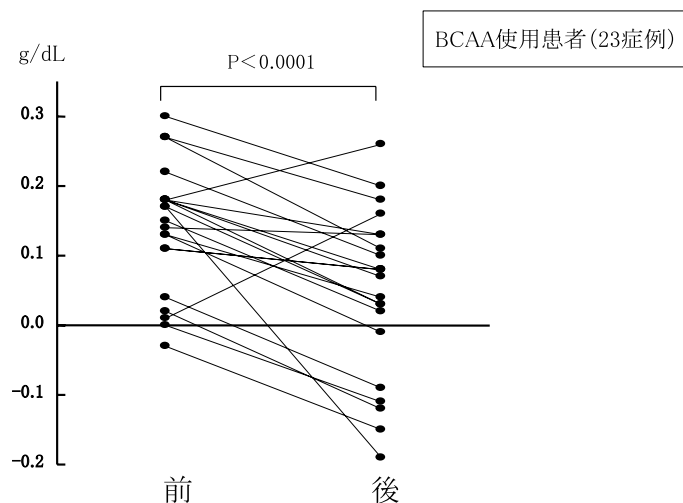


Fig. 7. 分岐鎖アミノ酸投与前後における血清アルブミン値の測定値の差
アルブミン値の測定値の差 = 血清アルブミン値 (BCP法) - 血清アルブミン値 (BCP改良法)

検討したが、投与前の0.14g/dLから0.05g/dLと測定値の差は減少していた。以上よりBCP法とBCP改良法による血清アルブミン値の測定値の差は酸化型アルブミンの比率をある程度反映していると考えられる。加藤ら³⁾の報告とあわせれば肝硬変においては酸化型アルブミンの増加によりアルブミンの体内分布が血管内から血管外へと変化し、分岐鎖アミノ酸投与によりアルブミンが酸化型アルブミンから還元型アルブミンへ変化し、その結果血管内のアルブミンが増加する。以上より著者らはBCP改良法による測定値は単にアルブミン濃度ではなくアルブミンの中の還元型アルブミンの比率も関係していると推測している。

6. 肝疾患診療とアルブミン製剤

肝硬変に合併した腹水の治療の第一歩は減塩食であり、減塩食により10%の症例で負のNaバランスが得られ¹⁵⁾、腹水の消失がみられるが、減塩食単独で効果がみられない場合には抗アルドステロン剤の投与が行われる¹⁶⁾。減塩食や利尿剤に反応しない腹水に対してアルブミン製剤の投与と利尿剤の投与が行われている。保存的治療に反応しない腹水に対して腹水穿刺排液が行われ、大量の腹水穿刺排液を行うにあたって循環動態を考量しアルブミン製剤の投与が行われる。アルブミンに質的差異が存在することは前項で述べたが血清アルブミンに質的差異が存在することからアルブミン製剤にも質的差異が存在する可能性が推測され、そのアルブミン製剤の質的差異がアルブミン製剤投与に際してその効果に差が出ると推測している。そこで著者らは臨床の現場で一般的に用いられる国内製アルブミン製剤と輸入アルブミン製剤に含まれるアルブミンについて検討を行った (Fig. 8)。検討に際してBCP法とBCP改良法の測定差はアルブミンのHNAの比率を反映するという仮説のもと検討した。国内製アルブミン製剤に比較して輸入アルブミン製剤はその測定差が有意に高値であったことから国内製アルブミン製剤に比較して輸入アルブミン製剤は酸化型アルブミンの含有量が多いことが推測される。そこでEllman法¹⁷⁾により国内外のアルブミン製剤のSH基について検証を行ったがEllman法によるSH基の

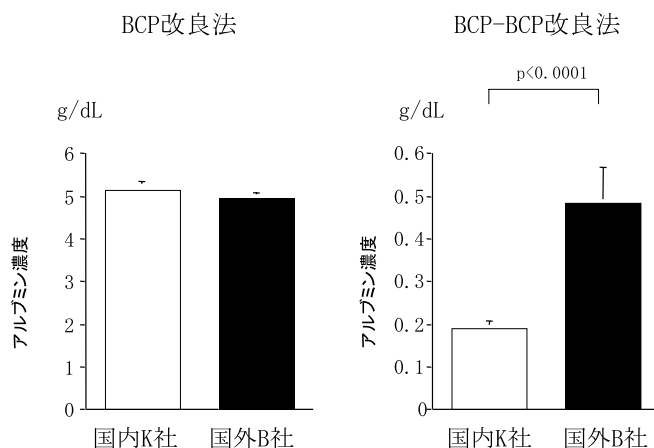


Fig. 8. アルブミン製剤別の血清アルブミン値 (自験例)

比は国内製アルブミン製剤で約30%であり、一方輸入アルブミン製剤では10%未満であり、BCP法とBCP改良法による測定差と同様の結果であった。また、坂田¹⁸⁾らは血清アルブミン値とHPLC法により還元型・酸化型アルブミン比(%)を測定し、体成分分析装置で浮腫率(extracellular fluid/total body fluid)との関連について検討し、酸化型アルブミン(%)と浮腫率の間に有意の相関を認めたと報告している。さらに有浮腫患者にアルブミン製剤を投与し体重減少について検討したところ酸化型アルブミン比(%)が低いアルブミン製剤の方が有意に体重を減少させると報告している。アルブミンの質的な変化が体水分の分布に影響を及ぼし、投与されるアルブミン製剤の酸化型アルブミンの比率もその浸透圧に影響を及ぼす可能性が指摘された。

7. まとめ

肝疾患の診療においてはアルブミン代謝状態を評価することは重要であり、単に血清アルブミン値を測定するだけではなく、アルブミンを質的にも評価することが重要である。また、腹水や浮腫の治療にアルブミン製剤を投与する場合には単にアルブミンを投与するのではなくアルブミン製剤の質的な差も考慮して製剤の選択を行うことも今後検討する必要がある、アルブミン製剤による治療効果についても検討してゆくことが今後の課題と考えられる。

参考文献

1. Patek AJ Jr, Post J: Treatment of cirrhosis of the liver by a nutritious diet and supplements rich in vitamin B complex. J Clin Invest 1941; 20: 481-505
2. Rothschild MA, Pratz M, Schreiber SS: serum albumin. Hepatology 1988; 8: 385-401
3. 加藤昌彦, 吉田貴, 森脇久隆, 他: 肝硬変患者の生体内アルブミン代謝動態に及ぼす経口分岐鎖アミノ酸製剤の影響. 肝臓 1991; 18: 692-699
4. Tajika M, Kato M, Mohri H, et al: Prognostic value of energy metabolism in patients with viral liver cirrhosis. Nutrition 2002; 18: 229-234
5. Gines P, Quintero E, Arroyo V, et al: Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. Hepatology 1987; 7: 12-18
6. Powell WJ, Klatskin G: Duration of survival in patients with

- Laennec's cirrhosis of liver. Am J Med 1968; 44: 406-420
7. D'Amico G, Marabita A, Pagliaro L et al: Survival and prognostic indicators in compensated and decompensated cirrhosis. Dig Dis Sci 1986; 31: 468-475
8. Llach J, Gines P, Arroyo V, et al: Prognostic value of arterial pressure, endogenous vasoconstrictive systems, and renal function in cirrhotic patients admitted to the hospital for the treatment of ascites. Gastroenterol 1988; 94: 482-487
9. 黒木哲夫, 西口修平, 仲島信也, 他: 肝硬変での栄養管理の実際 一般食事療法. 日本臨床 1994; 52: 197-201
10. Blackburn GL, Bistrian BR, Maini BS: Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patients. JPEN 1977; 1: 11-22
11. 村本良三, 松下誠, 入野勉: 正確度を改善したブロムクレゾールパープル法による血清アルブミン定量法の開発. 臨床化学 1997; 26: 38-43
12. 内田幸江, 奥住裕二, 藤代政浩, 他: 慢性肝疾患における栄養指標としての血清アルブミン値測定の問題点. 臨床病理 2006; 54: 1008-1012
13. Watanabe A, Matsuzaki S, Moriwaki H, et al: Problems in serum albumin measurement and clinical significance of albumin microheterogeneity in cirrhosis. Nutrition 2004; 20: 351-357
14. Fukushima H, Miwa Y, Shiraki M, et al: Oral branched-chain amino acid supplementation improves the oxidized/reduced albumin ratio in patients with liver cirrhosis. Hepatol Res 2007; 37: 765-770
15. Salo J, Guevara M, Femandex-Esparrach G, et al: Impairment of renal function during moderate physical exercise in cirrhotic patients with ascites: relationship with the activity of neurohormonal systems. Hepatology 1997; 25: 1338-1342
16. Santos J, Planas R, Pardo A, et al: Spironolactone alone or in combination with furosemide in the treatment of moderate ascites in nonazotemic cirrhosis. A randomized comparative study of efficacy and safety. J Hepatol 2003; 39: 187-191
17. Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 1959; 82: 70-77
18. 坂田雅浩, 川口巧, 安倍満彦, 他: 慢性肝疾患における酸化型アルブミンと体水分貯留の関連. 日消誌 2010; 107: A902

トランスフェリン修飾リポソームによる 細胞内送達とがん治療への応用

Intracellular targeting delivery of transferrin-PEG-liposomes to solid tumors

平田 圭一, 鈴木 亮, 小田 雄介, 野村 鉄也, 宇都口 直樹, 丸山 一雄

Keiichi Hirata, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama

和文抄録

リポソームは、毒性や抗原性が低く、薬物など種々の物質を封入できることから、有用な薬物キャリアーとして期待されている。リポソーム表面を polyethylene glycol (PEG) で修飾した PEG 修飾リポソームは、細網内皮系 (RES) の取り込み回避を特徴とした長期血中滞留型リポソームとして開発された。そのうえ、PEG-リポソームは enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) も有することから、がん組織などへ効率よく薬物などを送達可能な、パッシブターゲティング型リポソームとして利用されている。我々は、その PEG-リポソーム表面に、がん特異的なリガンドであるトランスフェリン (TF) を結合させることで、がん組織へのパッシブターゲティングのみならず、がん細胞内へのアクティブターゲティングを期待したリポソームの開発を試みた。まず、TF-PEG-リポソームの体内分布について検討した結果、長期血中滞留性に加え、がん組織で PEG-リポソームよりも優れた集積を示した。その技術を利用し、TF-PEG-リポソームに ^{10}B 化合物やオキサリプラチン (oxaliplatin: L-OHP) を封入して、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) やがん化学療法に適用した。担がんマウスを用いた治療効果を検討した結果、TF-PEG-リポソームは、いずれの療法においても、効率良いがん組織移行性と高い抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。本稿では、がん治療における TF-PEG-リポソームの可能性とその有用性について紹介する。

Abstract

Liposomes have some advantage as delivery carriers of drugs. A major development was the synthesis of PEG-liposomes with a prolonged circulation time in the blood. The PEG-liposomes are not readily taken up by the macrophages in the RES and hence stay in the circulation for a relatively long period of time. PEG-liposomes can take advantage of the EPR effect (enhanced permeability and retention effect) for efficient targeting in the tumor. For the active targeting following the passive targeting to the solid tumor tissue, transferrin (TF) was conjugated to prepare TF-PEG-liposomes. For intracellular targeting delivery to solid tumors based on EPR effects, TF-PEG-liposomes can stay in blood circulation for a long time and extravasate into the extravascular of tumor tissue by the EPR effect as PEG-liposomes. The extravasated TF-PEG-liposomes can maintain anti cancer drugs in interstitial space for a longer period, and deliver them into the cytoplasm of tumor cells via transferrin receptor-mediated endocytosis. TF-PEG-liposome was a suitable intracellular targeting carrier in Boron neutron capture therapy (BNCT) therapy and in chemotherapy by L-OHP for cancer. TF-PEG-liposomes improve the safety and efficacy of anti cancer drug by both passive targeting by prolonged circulation and active targeting by transferrin.

Keywords

Liposome, PEG-liposome, Transferrin, Boron neutron-capture therapy (BNCT), Oxaliplatin, Active targeting

1. はじめに

リポソームは、生体膜の主要構成成分であるリン脂質からなり、内部に水相を有する脂質二重膜の閉鎖小胞を形成している。そして、生体成分から構成されているために毒性や抗原性が低く、薬物、たん白質や核酸などを封入できることから、薬物送達システム (DDS) のキャリアーとして期待され研究が行われている。

リポソームを生体へ適用するにあたっては、血中に投与した場合、主に肝臓や脾臓の細網内皮系 (RES) により捕捉されてしまうことが欠点であった。このRESを回避することがリポソームのDDSキャリアーとしての課題とされた。そこで、リポソーム表面をpolyethylene glycol (PEG) で修飾したPEG修飾リポソーム (PEG-リポソーム) が、RES回避可能な長期血中滞留型リポソームとして開発された¹⁻³⁾。このPEG-リポソームに抗がん剤であるドキソルビシンを封入したDOXIL[®]は、本邦でも医薬品として臨床で実用化されている。また、近年ではPEG-リポソーム表面にたん白質や糖などの特異的リガンドを結合させたアクティブターゲティング型リポソームが、次世代のリポソーム型DDSキャリアーとして盛んに研究されている⁴⁻⁷⁾。筆者らの研究室では、アクティブターゲティング型リポソームとして、ヒト由来トランスフェリン (TF) をPEG-リポソーム表面に修飾した、TF-PEG-リポソームを開発し、がん治療を目的とした検討を行ってきた。

本稿では、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) への応用や抗がん剤であるオキサリプラチン (oxaliplatin; L-OHP) を封入したがん化学療法を例にあげて、がん治療におけるTF-PEG-リポソームの可能性とその有用性について紹介する。

2. がん細胞内送達を目的としたTF-PEG-リポソームによるアクティブターゲティング

薬物を封入したPEG-リポソームは、PEG未修飾リポソームと比較して、血中およびがん組織に高い薬物濃度の持続が認められる。マウス結腸がんColon-26細胞を移植した担がんマウスに、ドキソルビシン封入PEG-リポソーム (平均粒子径130nm) を投与すると、がん組織中のドキソルビシン濃度は徐々に高くなり、がんの退縮と延命効果が認められる⁸⁾。特にがん組織における薬物の集積は、PEG-リポソームによる長期血中滞留性に加えて、がん組織内で形成された脆弱な構造の新生血管から微粒子などが漏出しやすい性質として知られているEPR効果⁹⁾を利用したパッシブターゲティングの結果である。このような抗がん剤封入リポソームによる治療は、副作用の軽減と治療効果の向上を目的としたがん化学療法として、臨床の場においても用いられている (DOXIL[®]; ドキソルビシン封入PEG-リポソーム)。

現在は、上述のパッシブターゲティング型リポソームに加え、さらなる機能性を付与する目的で、標的部位に対する特異的なリガンド分子をリポソーム表面に結合させた、標的指向性を有するアクティブターゲティング型リポソームが考案されている

5, 10, 11)

筆者らは、がん細胞のターゲット分子として、多くのがん細胞膜上に過剰発現しているトランスフェリンレセプター (TFレセプター) に着目し^{12,13)}、そのリガンド分子であるTFを修飾したPEG-リポソーム (TF-PEG-リポソーム) を開発した^{4,7,14)}。がん細胞では、TFレセプターが正常細胞と比較してより高発現しており、その発現量はがん細胞の増殖能や悪性度と相関することも報告されている¹⁵⁾。TFは、生体内で鉄イオンの輸送体として働く約78kDaの糖たん白質であり、細胞表面のTFレセプターに結合した後、TFとTFレセプター複合体としてエンドサイトーシスを介して細胞内へ移行する。細胞内へ移行後、エンドソーム内のpHの低下に伴い、鉄イオンを付加したTFはその鉄イオンを遊離する。そして、鉄イオンを遊離したTFは、ライソソームとの融合を回避し、レセプターに結合したまま複合体としてエキソサイトーシス経路で細胞表面に輸送され、TFが放出される。そのTFサイクルに要する循環時間は平均約10分である^{16,17)}。したがって、TFをリガンドとしてTFレセプターを標的とすることは、単にがん組織を標的とするだけでなく、がん細胞内を標的とした有用なアクティブターゲティングになると考えられた。

そこで筆者らは、がん細胞内を標的とした、TF-PEG-リポソームの薬物送達キャリアーとしての有用性について検討を行った。TF-PEG-リポソームは、TFをPEG-リポソームのPEG鎖末端に結合させたペンダント型として調製した。TF分子がリポソームあたり約25分子結合したTF-PEG-リポソームを用いた。まず、*In vitro*において、TF-PEG-リポソームをヒト慢性骨髄性白血病細胞由来K562細胞に作用させた場合の透過型電子顕微鏡観察像では、TF-PEG-リポソームがエンドソームと考えられる細胞内の小胞に取り込まれていることが観察された (Fig. 1)。また、マウス結腸がん由来Colon-26細胞に作用させたところ、TF-PEG-リポソームの結合と速やかな受容体を介したエンドサイトーシスによる取り込みが認められた (データには示さず)。

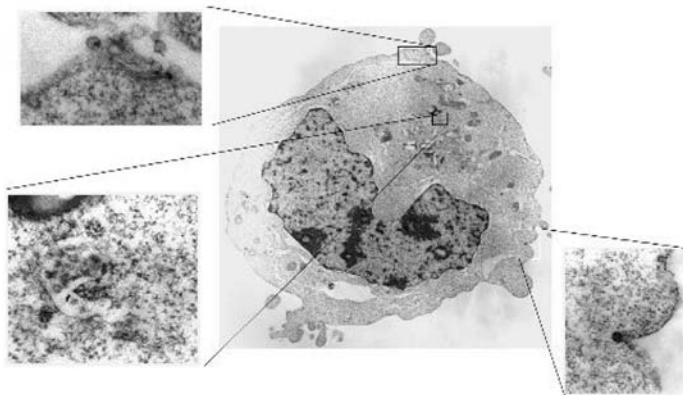


Fig. 1. Transmission electron micrograph of the localization of TF-PEG-liposomes in tumor cells. K562 cells were incubated with TF-PEG-liposomes entrapped by colloidal gold at 37°C for 30 min *in vitro*. TF-PEG-liposomes were observed on the plasma membrane and in the endosome in the process of endocytosis. Magnification; 40,000.

次に, *in vivo*において, TF-PEG-リポソームの体内分布やがん組織への集積性について検討した. Colon-26細胞担がんマウスにTF-PEG-リポソームを静脈内に投与した場合, 血中の長期滞留性やRESへの取り込みの軽減が認められ, 結果として固形がんへの集積が増強された. TF-PEG-リポソームは, PEG-リポソームと異なり, 投与60時間以上においてもがん組織内で高い濃度を維持することが可能であった (Fig. 2-3). 以前に, Liuらと筆者らは, PEG-リポソームのがん組織への集積について, リポソームサイズが平均粒子径200 nm以下と比較的小さな場合, 血中とがん組織内のリポソーム濃度に強い相関関係を示すことを明らかにした^{14,18)}. 本検討において, PEG-リポソームとTF-PEG-リポソームは, それぞれの粒子径が約120 nmであり, 血中濃度において差は認められなかった. しかしながら, がん組織内へ集積したTF-PEG-リポソームの滞留時間は, PEG-リポソームと比較して非常に長かった. そのことは, EPR効果によりがん組織内の間質に漏出して蓄積したTF-PEG-リポソームが, 後にTFレセプターを介した取り込みでがん細胞内へ移行

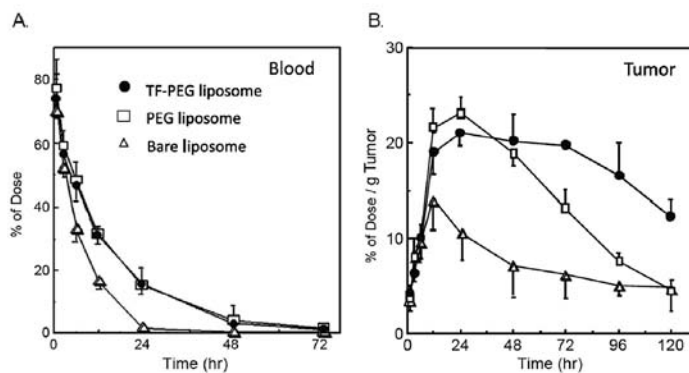


Fig. 2. Time courses of blood residence and tumor accumulation of TF-PEG-liposomes, with an average of 25 TF molecules per liposome, after intravenous injection. Liposomes (100-130 nm average diameter) labeled with ^3H -CHE were injected into Colon-26 tumor-bearing mice at a dose of 500 μg lipid. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=3-5).

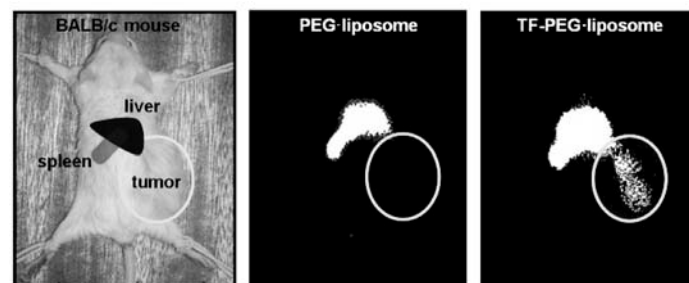


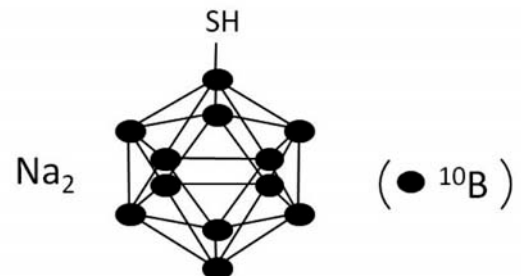
Fig. 3. Gamma ray imaging of TF-PEG-liposome in Colon-26 solid tumor tissue *in vivo*. TF-PEG-liposomes of 132 ± 38 nm mean diameter, entrapping ^{111}In -DTPA and coupling an average of 25 TF molecules per liposome, were injected into mice via the tail vein, and gamma ray imaging were taken 60 hr after administration.

したためと考えられる. また, Huwylerらは, *in vivo*において内在性の血中TFによるTFレセプターの飽和について指摘している^{19,20)}. つまり, 内在性TFによる強い競合が, TF-PEG-リポソームのレセプターへの結合を顕著に阻害する可能性が考えられた. しかしながら, *in vivo*におけるTF-PEG-リポソームのがん組織内濃度のデータから (Fig. 2B), TF-PEG-リポソームのTFレセプターへの結合は, 内在性TFによって顕著に阻害されないことが示唆された. これらの結果から, TF-PEG-リポソームは, がん細胞内を標的とした, がん組織への薬物送達キャリアーとして有用であることが示された.

3. 固形がんを標的としたmercaptoundecahydrododecaborate (^{10}B SH) 封入TF-PEG-リポソームによるアクティブターゲティングとBNCTへの応用

BNCTは, 中性子線の照射によるホウ素の核反応を利用した, がん細胞を選択的に殺傷することを期待した治療法として注目されている²¹⁾. そこで利用される ^{10}B 原子は, ホウ素の安定同位体であり, 中性子線を照射すると瞬時に崩壊して, ヘリウム原子核 (α 粒子) とリチウム反跳核 (^7Li) の粒子放射線を生成する. それら α 粒子 (1.47~1.76 MeV) と ^7Li (0.84~1.01 MeV) は殺細胞効果を得るに十分なエネルギーを有しており, 反応部位からの飛程は10 μm 以内とほぼ細胞1個分であることが特徴である. また, 照射に用いる中性子線は, 比較的エネルギーが低いために (< 0.4 eV) がん細胞や正常細胞にはほとんど影響を与えないと考えられている. したがって, 効果的なBNCTの達成には, ^{10}B 原子をがん組織内, 特にはがん細胞内へ選択的に集積させ, 正常細胞に影響なくがん細胞のみを殺傷することが重要と考えられる²²⁾.

BNCTの治療効果を十分に得るためには, がん組織重量あたりの ^{10}B 濃度が20-30 $\mu\text{g/g}$ 必要と考えられている²³⁾. この時, 血中や他の組織にある正常細胞への影響を考慮して, 血中 ^{10}B 濃度を可能な限り抑える必要がある. そこで筆者らは, ^{10}B 化合物である ^{10}B SH (Fig. 4) をTF-PEG-リポソームに封入することで, がん細胞選択的な ^{10}B の送達について検討した³⁾. 平均粒子径100-200 nmに調整した ^{10}B SH封入TF-PEG-リポソームは, ^{10}B 投与量が35 mg/kgとなるように, Colon-26担がんマウスの静



mercaptoundecahydrododecaborate (^{10}B SH)

Fig. 4. Chemical structure of mercaptoundecahydrododecaborate (^{10}B SH)

脈内に投与した。その結果として、TF-PEG-リポソームとPEG-リポソームは、血中AUCと相関したがん組織内への高い集積が認められた (Fig. 5-6)。特に、TF-PEG-リポソームは、投与72時間後においても、がん組織重量あたり $30 \mu\text{g} / \text{g}$ 以上の高い ^{10}B 濃度を有した。その時、 ^{10}B 濃度において、がん組織内濃度/血中濃度の比は約6.0となった。そのTF-PEG-リポソームによる ^{10}B の高い集積は、血管から漏出したTF-PEG-リポソームがTFレセプターと結合した後、エンドサイトーシスにより取

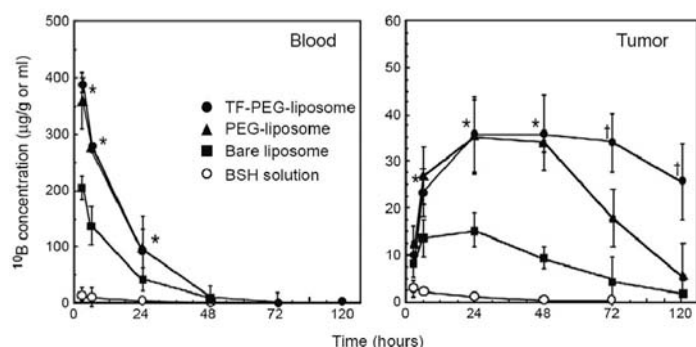


Fig. 5. Time courses of blood residence and tumor accumulation of ^{10}B delivered by each kind of liposome encapsulating BSH, and by BSH solution, in Colon-26 tumor-bearing mice. Two hundred to $300 \mu\text{l}$ of BSH-TF-PEG-liposomes, BSH-PEG-liposomes, BSH bare liposomes or BSH solution was injected into tumor-bearing mice via the tail vein at a dose of $35 \text{ mg } ^{10}\text{B}/\text{kg}$. TF-PEG-liposomes, with an average of 25 TF molecules per liposome, were used. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. ($n=5$).

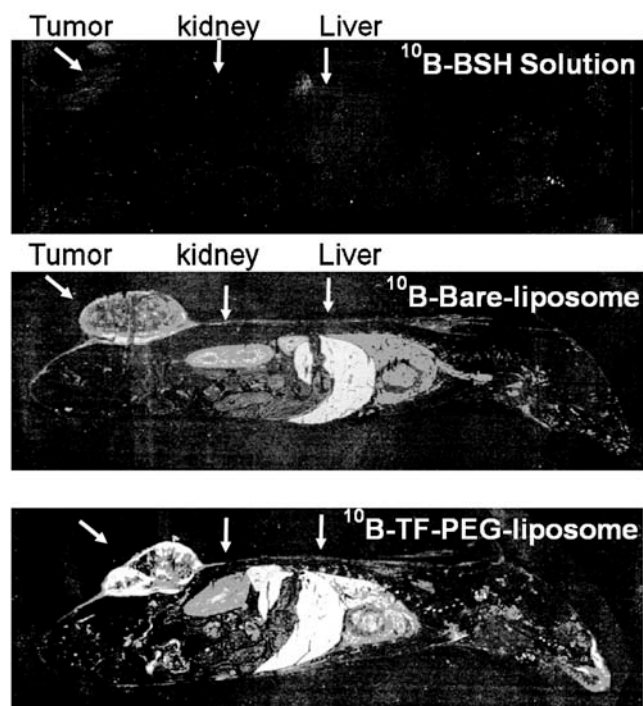


Fig. 6. Neutron capture autoradiography images of the whole-body section of Colon-26 bearing mice at 48 hr after i.v. injection.

り込まれた結果と考えられる。

中性子線の照射を行う際は、血中および正常組織の ^{10}B が高濃度であると、おもに血球や正常組織にある正常細胞に重篤な傷害が懸念される²⁴⁾。TF-PEG-リポソーム投与72時間後の血中 ^{10}B 濃度は、顕著に減少していた。したがって、TF-PEG-リポソーム投与72時間以降がBNCT療法の適した治療のタイミングと考えられた。次に、これらの結果を踏まえて、Colon-26細胞担がんマウスに ^{10}B 封入TF-PEG-リポソームを適用し、BNCTにおける有用性を延命効果により評価した。 ^{10}B 封入TF-PEG-リポソームを $5-35 \text{ mg} / \text{kg } ^{10}\text{B}$ で静脈内に投与し、 $2 \times 10^{12} \text{ n} / \text{cm}^2$ の条件で中性子線を37分間照射した。そのTF-PEG-リポソームの治療効果は、 ^{10}B 水溶液、 ^{10}B を封入したPEG未修飾リポソームやPEG-リポソームと比較して、がんの増殖抑制とともにマウスの延命効果が認められた (データには示さず)³⁾。

このようにTF-PEG-リポソームを用いることによって、中性子線照射時に ^{10}B 血中濃度が限りなく低く、がん組織内 ^{10}B 濃度が有効濃度以上を維持する条件が見出され、正常組織に顕著な傷害を与えることなく抗腫瘍効果を発揮させることが可能となった。これは、がん組織に移行したTF-PEG-リポソームがTFレセプターを介してがん細胞内に取り込まれた結果によるものと考えられ、細胞内送達的重要性が示された。

4. L-OHP 封入TF-PEG-リポソームによるアクティブターゲティングとがん化学療法への応用

1984年に白金錯体系抗がん剤として初めて承認されたシスプラチンは、切れ味が鋭く、有効性の高い抗がん剤として、25-30年にわたりいくつかのがんの第一選択薬として用いられてきた。しかしながら、その有効性の反面、腎毒性、骨髄機能抑制や神経症状による感覚性の機能障害などの副作用が問題とされる。L-OHP (Fig. 7) は、新規の白金錯体系抗がん剤として2004年に本邦で承認された。シスプラチンと比べて、腎毒性や骨髄機能抑制などの副作用が軽微なことが知られている。そのL-OHPは、単剤投与による有効性は確立されておらず、フルオロウラシル (5-FU) やホリナートなど他の抗がん剤との併用に限り使用が認められている。L-OHP単剤投与における有効性が乏しい理由として、高い血漿たん白結合率と赤血球や脾臓への移行性が原因と推察される。そのために、がん組織への送達効率が低

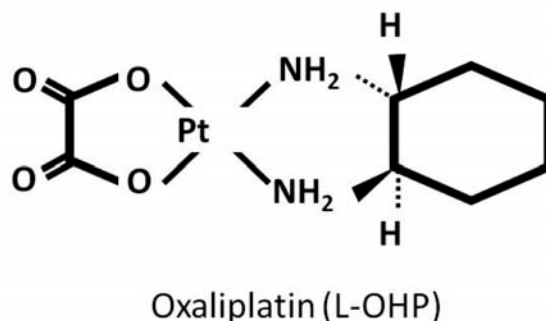


Fig. 7. Chemical structure of oxaliplatin (L-OHP)

いことが起因していると考えられた。筆者らは、L-OHPをTF-PEG-リポソームに封入し、がん細胞にL-OHPを効率よく送達させることができれば、L-OHP単剤でも効果的に抗腫瘍効果が得られると考えた。そこで、Colon-26担がんマウスを用いて、L-OHP封入TF-PEG-リポソームの有用性について検討した²⁵⁾。まず、血中動態について検討した結果、静脈内に投与したL-OHP水溶液やL-OHP封入PEG未修飾リポソームは速やかに血中から消失した。一方、L-OHP封入TF-PEG-リポソームとPEG-リポソームには血中滞留時間の延長が認められた (Fig. 8A)。次に、静脈内投与6時間後の各リポソームのL-OHP体内分布 (肝臓、脾臓、膵臓と肺) について比較検討した。L-OHP水溶液は、各臓器共に顕著な集積は観察されなかった。一方、各リポソームでは、脾臓や肝臓で比較的に高い集積がみられた。しかしながら、PEG未修飾リポソームと比較してPEG-リポソームやTF-PEG-リポソームは顕著に低かった。TF-PEG-リポソームは、PEG末端にTFを修飾したにもかかわらず、おもに肝臓や脾臓への集積がPEG-リポソームとほぼ等しいことから、PEG-リポソームと同等のRES回避が可能であったと考えられる。その理由として、TFが血中糖たん白質であるために、RESのマクロファージに認識されず貪食を逃れたためと推察された (Fig. 8B)。

次に、Colon-26担がんマウスについて、L-OHPのがん組織への分布を経時的に観察した。その結果、L-OHP水溶液とL-OHP封入PEG未修飾リポソームでは、投与18時間後のがん組織内L-OHP濃度が、がん組織当たりそれぞれ $0.98 \mu\text{g} / \text{g}$ 、 $2.1 \mu\text{g} / \text{g}$ とピーク値を示し、それ以降は減少した。それらと比較して、PEG-リポソームとTF-PEG-リポソームは、より高いがん組織内濃度であり、PEG-リポソームにおいては投与30時間後にピークを示し、それ以降は減少した。興味深いことに、TF-PEG-リポソームはPEG-リポソームと異なり、投与後72時間後に至るまでがん組織内濃度の増加傾向が観察された (Fig. 8C)。この結果からも、前項の検討と同様に、TF-PEG-リポソームは、がん組織への薬物送達において有用なキャリアーであることが示された。

最後に、L-OHP封入TF-PEG-リポソームのがん治療効果を、投与開始直前のがん組織の体積に対する、経時的ながん組織の増殖比率により評価した。増殖比率; tumor growth ratioは (1) 式で算出した。

$$\text{Tumor growth ratio} = \frac{\text{測定時のがん組織体積}}{\text{治療開始直前のがん組織体積}} \dots (1)$$

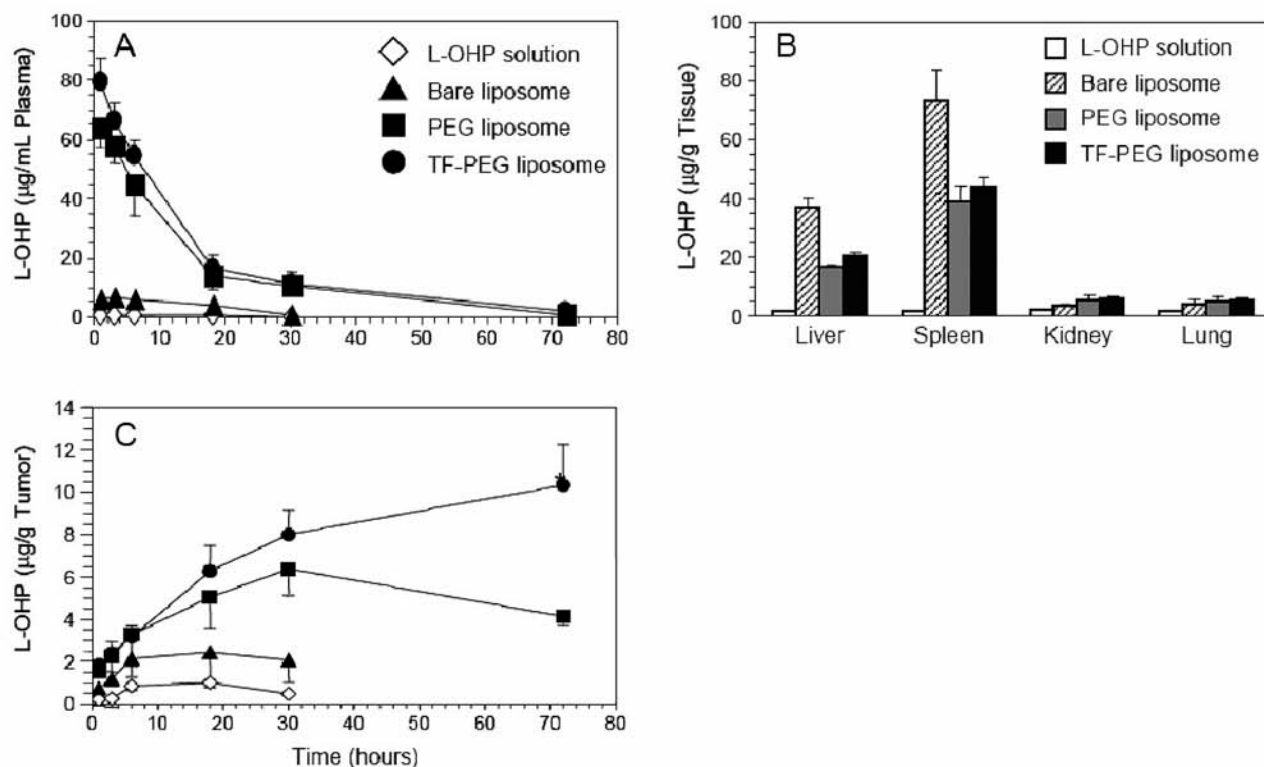


Fig. 8. Plasma clearance (A), biodistribution (B) and tumor accumulation of L-OHP solution or liposomal L-OHP in Colon-26-bearing mice (C). L-OHP in solution or encapsulated within Bare, PEG- or TF-PEG-liposomes (L-OHP: 5 mg/kg) was injected via tail veins of Colon-26-bearing mice. A: At various times thereafter, blood samples were collected using glass capillaries from veins of fundus oculi. Plasma L-OHP levels were measured by MIP-MS. B: Six hours later, mice were sacrificed and liver, spleen, kidneys and lungs were collected. C: At various times thereafter, tumor tissue was collected from the mice. Concentrations of L-OHP in tissue samples were measured by MIP-MS.

薬物治療を行っていないControlと比較して、L-OHP水溶液およびL-OHPを封入した各リポソーム全てにがんの増殖抑制効果が観察された。その効果は、L-OHP封入TF-PEG-リポソームが最も効果が高く、他のL-OHP水溶液、L-OHP封入PEG未修飾リポソームやL-OHP封入PEG-リポソームは同等の効果であった。TF-PEG-リポソームの高いがん増殖抑制効果は、L-OHP封入PEG-リポソームに対しても有意な差が得られるほど顕著であった (Fig. 9)。L-OHPを用いた効率的ながん治療の達成には、L-OHPの作用機序がDNAの架橋など細胞内で薬効を発現することを考慮した戦略が重要と考えられた²⁶⁾。実際に、L-OHP水溶液とL-OHP封入PEG-リポソームの治療効果に差がなかったように、たとえEPR効果ががん組織内の間質まで送達されたとしても、TF-PEG-リポソームのようにエンドサイトーシスで細胞に取り込まれるような、細胞内送達が必要であることが示された。

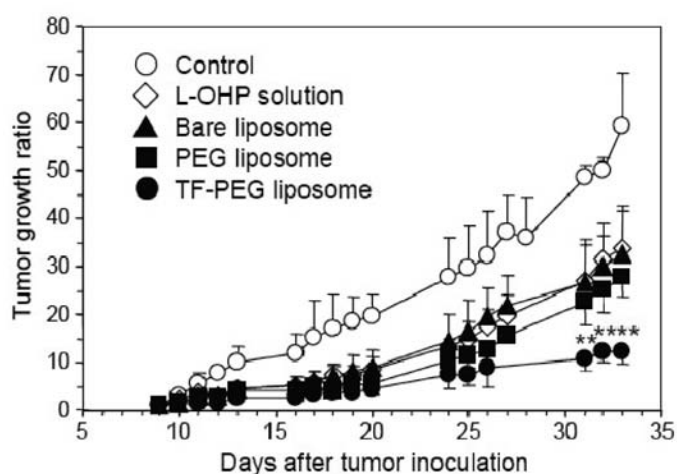


Fig. 9. Comparison of tumor growth suppression with L-OHP in solution and in liposomes in Colon-26-bearing mice. L-OHP solution or L-OHP encapsulated within Bare, PEG- or TF-PEG-liposomes (L-OHP: 5 mg/kg) was injected via tail veins of Colon-26-bearing mice on days 9 and 12 after tumor cells inoculation. Data are shown as means and standard deviation (n=4). **P<0.01 (PEG-liposomes vs. TF-PEG-liposomes).

L-OHPは、腎毒性や骨髄機能抑制などの副作用が軽微ものの神経症状による感覚性の機能障害などが懸念されている。TF-PEG-リポソームは、がん組織のみならず、おもに肝臓などの他臓器への集積がL-OHP水溶液と比較して高かった。今回データには示さないが、L-OHP封入TF-PEG-リポソームの副作用について、血液生化学的検査、L-OHPの脳への移行性および異常行動や体重推移を指標として、マウスを用いて検討した。L-OHP封入TF-PEG-リポソーム投与後の血液生化学的検査結果からは、異常は認められなかった。そして、投与72時間後におけるL-OHPの脳への移行については、組織あたり0.06 $\mu\text{g} / \text{g}$ と非常に低い値を示し、マウスに異常行動などは観察されなかった。

さらに、投与後の体重減少も見られなかったことから、L-OHP封入TF-PEG-リポソームは、顕著な副作用が観察されず、安全性に優れた製剤であることが示された。

筆者らはL-OHPの有効性および安全性の問題に対して取り組み、TF-PEG-リポソームにL-OHPを封入することで、それら問題点を改善することが可能となった。これらのことから、細胞表面にTFレセプターを高発現するがんに対して、細胞内送達可能なTF-PEG-リポソームのがん治療への有用性が明らかとなり、今後の展開が期待される。

5. おわりに

PEG-リポソームによるパッシブターゲティングの有用性が明らかになるに従い、さらなる機能性リポソームが考案されて開発が進められている。リポソームは、その構成脂質組成を容易に変更可能なことや表面への機能性分子の付与が可能なることから、ユニークな製剤が開発されている。たとえば、リポソーム膜の電荷、温度感受性、pH感受性、融合能の付与や糖、ペプチド、たん白質などのリガンドを結合させた製剤が治療目的に応じて利用され、その効果が期待されている²⁷⁻³²⁾。筆者らが着目した、がんを標的とするアクティブターゲティング型リポソームを利用した化学療法についても多くの試みが行われている。本稿の検討から、その開発における重要な点は、単に薬物を標的組織内の間質に集積させるだけでなく、がん細胞内へ集積させる点に配慮した製剤設計が必要と考えられた³³⁾。そのためには、1) 治療効果を得るに十分量の標的分子が細胞表面に発現していることを確認する、2) 血中滞留性に影響しないリガンドの選別や設計、3) アクティブターゲティング型リポソームの細胞内への移行性を考慮する、4) 治療上有効な薬物量の送達かつ適切な時間維持が可能であること、などに着目することが、より効果的な製剤開発の達成につながると考えられる。

本研究をベースに開発されたL-OHP内封TF修飾リポソーム製剤であるMBP-426は、日本のベンチャー企業によって開発が進められている。現在、臨床第I相試験が終了し³⁴⁾、次いで臨床第II相試験が進行中である。今後は、がん治療における有効性および安全性の高い次世代アクティブターゲティング型リポソームとして、臨床での成果が期待される。

参考文献

1. Maruyama K, Holmberg E, Kennel SJ, Klivanov A, Torchilin VP, Huang L. Characterization of in vivo immunoliposome targeting to pulmonary endothelium. *J Pharm Sci* 1990; 79: 978-984.
2. Maruyama K, Kennel SJ, Huang L. Lipid composition is important for highly efficient target binding and retention of immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 5744-5748.
3. Maruyama K, Ishida O, Kasaoka S, Takizawa T, Utoguchi N, Shinohara A, Chiba M, Kobayashi H, Eriguchi M, Yanagie H. Intracellular targeting of sodium

- mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to solid tumors by transferrin-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT). *J Control Release* 2004; 98: 195-207.
4. Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K, Eriguchi M, Yanagie H. Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharm Res* 2001; 18: 1042-1048.
5. Maruyama K, Ishida O, Takizawa T, Moribe K : Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 40: 89-102.
6. Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Maruyama K. Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology. *Int J Pharm* 2008; 354: 49-55.
7. Iinuma H, Maruyama K, Okinaga K, Sasaki K, Sekine T, Ishida O, Ogiwara N, Johkura K, Yonemura Y. Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int J Cancer* 2002; 99: 130-137.
8. Unezaki S, Maruyama K, Ishida O. Enhanced tumor targeting and improved antitumor activity of doxorubicin by long-circulating liposomes containing amphipathic poly (ethylene glycol). *Int J Pharm* 1995; 126: 41-48.
9. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : Mechanism and antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986; 46: 6387-6392.
10. Allen TM. Liposomal drug formulations. Rationale for development and what we can expect for the future. *Drugs* 1998; 56: 747-756.
11. Uyama I, Kumai K, Yasuda T, Tagawa T, Ishibiki K, Kitajima M, Tadakuma T. Improvement of therapeutic effect by using Fab' fragment in the treatment of carcinoem bryonic antigen-positive human solid tumors with adriamycinentrapped immunoliposomes, *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 434-440.
12. Keer HN, Kozlowski JM, Tsai YC, Lee C, McEwan RN, Grayhack JT. Elevated transferrin receptor content in human prostate cancer cell lines assessed in vitro and in vivo. *J Urol* 1990; 143: 381-385.
13. Ishida O, Maruyama K, Sasaki K, Iwatsuru M. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *Int J Pharm* 1999; 190: 49-56.
14. Kakudo T, Chaki S, Futaki S, Nakase I, Akaji K, Kawakami T, Maruyama K, Kamiya H, Harashima H. Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry* 2004; 43: 5618-5628.
15. Miyamoto T, Tanaka N, Eishi Y, Amagasa T. Transferrin receptor in oral tumors. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994; 23: 430-433.
16. Thorstensen K, Romslo I. The transferrin receptor: its diagnostic value and its potential as therapeutic target. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1993; 215: 113-120.
17. Wagner E, D Curiel, Cotton M. Delivery of drugs, proteins and genes into cells using transferrin as a ligand for receptor-mediated endocytosis. *Adv Drug Deliv* 1994; 14: 113-135.
18. Liu D, Mori A, Huang L. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1104: 95-101.
19. Huwyler J, Drewe J, Krähenbuhl S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *Int J Nanomedicine* 2008; 3: 21-29.
20. Pardridge WM. Brain drug delivery and blood-brain barrier transport. *Drug Deliv* 1993; 1: 83-101.
21. Hawthorne MF. The role of chemistry in the development of boron neutron capture therapy of cancer. *Angew Chem Int Ed Engl* 1993; 32: 950-984.
22. Barth RF, Soloway AH, Fairchild RG. Boron neutron capture therapy for cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 1061-1070.
23. Barth RF, Soloway AH, Fairchild RG, Brugger RM. Boron neutron capture therapy for cancer. *Cancer* 1992; 70: 2995-3007.
24. Stathopoulos GP, Boulikas T, Vougiouka M, Deliconstantinos G, Rigatos S, Darli E, Viliotou V, Stathopoulos JG. Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): phase I study. *Oncol Rep* 2005; 13: 589-595.
25. Suzuki R, Takizawa T, Kuwata Y, Mutoh M, Ishiguro N, Utoguchi N, Shinohara A, Eriguchi M, Yanagie H, Maruyama K. Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome. *Int J Pharm* 2008; 346: 143-150.
26. Pendyala L, Kidani Y, Perez R, Wilkes J, Bernacki RJ, Creaven PJ. Cytotoxicity, cellular accumulation and DNA binding of oxaliplatin isomers. *Cancer Lett* 1995; 97: 177-184.
27. Gao X, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 280-285.
28. Sullivan SM, Huang L. Preparation and characterization of heat-sensitive immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 812: 116-126.
29. Connor J, Huang L. Efficient cytoplasmic delivery of a fluorescent dye by pH-sensitive immunoliposomes. *J Cell Biol* 1985; 101: 582-589.
30. Kitajima I, Hanyu N, Soejima Y, Hirano R, Arahira S,

- Yamaoka S, Yamada R, Maruyama I, Kaneda Y. Efficient transfer of synthetic ribozymes into cells using hemagglutinating virus of Japan(HVJ)-cationic liposomes. Application for ribozymes that target human t-cell leukemia virus type I tax/rex mRNA. *J Biol Chem* 1997; 272: 27099-27106.
31. Harata M, Soda Y, Tani K, Ooi J, Takizawa T, Chen M, Bai Y, Izawa K, Kobayashi S, Tomonari A, Nagamura F, Takahashi S, Uchimaru K, Iseki T, Tsuji T, Takahashi TA, Sugita K, Nakazawa S, Tojo A, Maruyama K, Asano S. CD 19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2004; 104: 1442-1449.
32. Mizoue T, Horibe T, Maruyama K, Takizawa T, Iwatsuru M, Kono K, Yanagie H, Moriyasu F. Targetability and intracellular delivery of anti-BCG antibody-modified, pH-sensitive fusogenic immunoliposomes to tumor cells. *Int J Pharm* 2002; 237: 129-137.
33. Torchilin VP. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example, in: M. Schafer-Korting (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology* 197. Berlin: Springer-Verlag. 2010; 4-36.
34. Sankhala KK, Mita AC, Adinin R, Wood L, Beeram M, Bullock S, Yamagata N, Matsuno K, Fujisawa T, Phan A. A phase I pharmacokinetic(PK) study of MBP-426, a novel liposome encapsulated oxaliplatin. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2535.

オーバーハウザーMRIを用いた生体レドックス疾患の可視化

In vivo Molecular Imaging of Tissue Redox Status using Overhauser Magnetic Resonance Imaging

兵藤 文紀, 内海 英雄

Fuminori Hyodo, Hideo Utsumi

和文抄録

心筋梗塞や脳梗塞に代表される虚血・再灌流傷害, がん, 糖尿病などの生活習慣病の発症・進展に, 活性酸素種・フリーラジカルの過剰生成や生体抗酸化機構の減弱によるレドックス均衡の破綻の関与が明らかとなってきた。生きた動物を用いた生体レドックス動態の視覚化により, これらの疾患の病態解明や新しいメカニズムによる治療, 創薬などへの展開が期待される。オーバーハウザーMRIはレドックス検出薬としてニトロキシラジカルを用い, 生体レドックス状態を視覚化する装置である。我々はこれまでにOMRI装置開発を行うと共に, 病態モデル動物における生体レドックス解析を行ってきた。またOMRIを用いた酸素濃度, pHなど生体機能の可視化手法の開発に取り組んでいる。本総説ではOMRIを用いた生体レドックス解析について紹介する。

Abstract

Disruption of redox homeostasis may lead to oxidative stress and can induce many pathological conditions such as cancer, neurological disorders, and aging. Therefore, imaging of tissue redox status could have a potential for clinical applications and clarification of mechanism for drug treatment in many diseases. Overhauser MRI (OMRI) is a powerful technique for imaging in vivo redox status and tissue function such as oxygen level and pH non-invasively. We have developed nanometer scale imaging methods and simultaneous assessment of redox process using OMRI with ^{14}N -, ^{15}N -labeled nitroxyl probes. In this review, we will introduce in vivo redox imaging technique using OMRI.

Keywords

OMRI, redox imaging, free radical, MRI, nitroxyl radical, ESR

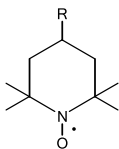
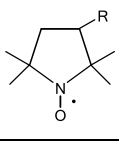
1. はじめに

生体機能イメージングは, ヒトまたは動物から組織を摘出することなく生体機能を描写でき, 生体内で発生しているイベントの動的な変化を追跡できることから, 病態解析や創薬への応用が期待され, 近年めざましい進歩を遂げている。超音波診断装置や核医学検査 (positron emission tomography (PET) や single photon emission computed tomography (SPECT)), CT, MRIなどは現在臨床において汎用されているイメージング装置であり, それぞれ目的に応じ用途が異なる。超音波診断装置は安価でX線被爆がなくリアルタイムな画像が簡便に得られるため, 胸部や腹部の診断に用いられている。CTはX線による被爆があるものの短時間に高解像度の解剖学的画像を得ることが可能で, がん診断などに汎用されている。PETやSPECTでは

造影剤として体内に放射性同位元素を含む分子を投与し, その特異的な分布情報からガンなどの病巣を検出することができる。また近年開発が進む蛍光や発光などを利用するオプティカルイメージング法は, 利用する光の透過性が低いことから, 生体表面の計測に適した方法である。様々な機能を可視化するための新規プローブ開発が進み, 今後の生体応用への展開が期待されている。MRIや本総説で紹介するオーバーハウザーMRI (OMRI) などの磁気共鳴法では, 核や電子が持つ磁気モーメントと磁場との相互作用により生じたエネルギー準位間の電磁波遷移を観測の対象としている。核スピンを対象とする場合には核磁気共鳴装置 (NMR; Nuclear magnetic resonance) を用い, 電子スピンを対象とする場合には電子スピン共鳴装置 (ESR; Electron spin resonance) を用いる。磁気共鳴法による分子イ

メーシングでは、生体浸透性の高い低周波電磁波（100 MHz ～ 1 GHz: 生体透過性 20 cm ～ 2 cm）が用いられ、ヒトや動物を測定する上で透過性の問題はない。また、ニトロキシラジカル（Table 1）は生体レドックス解析（レドックス（redox）とは、還元（reduction）と酸化（oxidation）を示す略語）のためのスピンプローブとして用いられているが、生体内で常磁性を失うとそれに伴い信号強度も失う。すなわち、生体内のラジカル反応に由来する代謝を視覚化することができる。またニトロキシラジカルには多くの誘導体が存在し、これらを目的に応じ使い分けることで反応場の異なる生体応答を解析できる。例えば 4-hydroxy Tempo（Tempol）や methoxycarbonyl-PROXYL（MC-PROXYL）は高い細胞膜透過性を持ち（両プロローブは血液脳関門も通過し脳内のレドックス解析にも活用可能）、分布した臓器・組織の細胞内レドックス反応を鋭敏に描写する。一方、細胞膜非透過性ニトロキシラジカルである carboxy-PROXYL は、細胞内には移行せず血管内に滞留するため血液中のレドックス解析に適している。故に両者（細胞膜透過・非透過）のスピンプローブを共投与したマウスを OMRI で同時分離画像解析（3-1 で詳細説明）すれば、同一個体における細胞内・外のレドックス変動の解析が可能である。また OMRI の造影剤として他のラジカルプロローブ剤を活用することで（同様にプロローブの性質により細胞内外など得られる場の情報が異なる）pH、酸素分圧（pO₂）などの生体機能情報を可視化することが可能となる。

Table 1. 生体計測 ESR/スピンプローブ法で汎用されるニトロキシラジカル

基本構造	置換基(R)	略語
	—OH	hydroxy-TEMPO(TEMPOL)
	=O	oxo-TEMPO
	—COOH	carboxy-TEMPO
	—N ⁺ (CH ₃) ₃	trimethylammonium-TEMPO (CAT-1)
	—CONH ₂	carbamoyl-PROXYL
	—COOH	carboxy-PROXYL
	—COOCH ₃	MC-PROXYL
	—COOCH ₂ OCOCH ₃	AMC-PROXYL

2. 生体レドックス応答プロローブ：ニトロキシラジカル

近年、高血圧や糖尿病、心筋梗塞や脳梗塞に代表される虚血再還流傷害、がん、糖尿病などの生活習慣病の発症・進展に、活性酸素種生成から始まるレドックスバランスの破綻の関与が知られており、生体レドックスを新たな標的とした治療、診断の重要性が高まってきている。生体レドックス変動を解析する方法として生体計測 ESR が用いられてきた⁽¹⁻⁵⁾。通常、生体内で生成する活性酸素種は微量であるため、直接検出することは難しい。従って、ESR を用いる生体レドックス解析にはニトロキシラジカルをスピンプローブとして用いることが必要である。

ニトロキシラジカルは 1950 年代後半から 1960 年代にかけて、多種類が合成され、1965 年以降にスピラベル法の標識化

合物としてタンパク質や核酸の構造解析や膜流動性の研究に応用されてきた⁽⁶⁾。これらの研究を通じて、ニトロキシラジカルが生体内酸化還元酵素や遷移金属と反応しその常磁性を消失すること、また自動酸化による樹脂の光劣化の防止剤としてニトロキシラジカルが多用されていること、活性酸素消去作用を有することなどが報告された⁽⁷⁻⁹⁾。事実、ニトロキシラジカルは生体酸化還元電位と近い電位で電気化学的に酸化還元反応が起こり、酸化によりオキソニウム塩が、還元によりヒドロキシラジカルが生成する。著者らはこれらの反応に着目し、ニトロキシラジカルをスピンプローブとすることで生体内活性酸素生成を評価できるものと考え前述したように、多くの酸化ストレス疾患に応用し有用性を示すことで、「生体計測 ESR/スピンプローブ法」を提唱してきた。Table 2 に本法を用いて解析された疾患一覧を示す。このように生体計測 ESR/スピンプローブ法により様々な病態において生体内フリーラジカル生成を伴うレドックス変動が密接に関係していることが証明されている。この解析法では、ニトロキシラジカル（代表的なニトロキシラジカルを Table 1 に示す）を疾患モデル動物の静脈、気道、胃などに投与し、その ESR シグナルの時間経時変化を追跡すると、酸化ストレスの有無により経時変化が異なることを利用したもので、減衰速度の変動に及ぼす各種抗酸化剤、酵素阻害剤の影響を評価することで、生体内の活性酸素の生成とそのメカニズムを明らかにすることが出来る。

ニトロキシラジカルは磁気共鳴画像装置を用いた生体レドックスイメージングの造影剤としても用いられる。次項からは OMRI を用いた生体レドックス画像解析法について紹介する。

Table 2. 生体計測 ESR/スピンプローブ法で解析された病態モデル

疾患モデル	著者	雑誌名(掲載年)
高酸素・低酸素状態	Miura, Y. <i>et al.</i>	Biochem. Biophys. Res. Commun.(1992)
虚血-再灌流障害	Utsumi, H. <i>et al.</i>	Free Radic. Res. Commun.(1993)
X線照射	Miura, Y. <i>et al.</i>	Free Radic. Biol. Med.(1997)
ストローク/脳卒中誘発糖尿病	Sano, T. <i>et al.</i>	Diabetologia(1998)
ガン細胞(RIF-1)移植	Kuppusamy, P. <i>et al.</i>	Cancer Res.(1998)
鉄過剰症	Phumala, N. <i>et al.</i>	Free Radic. Biol. Med.(1999)
カニン酸誘発てんかん発作	Yokoyama, H. <i>et al.</i>	Free Radic. Biol. Med.(1999)
ディーゼル粒子惹起肺障害	Han J.Y. <i>et al.</i>	Free Radic. Biol. Med.(2001)
心不全	Tsutsui H. <i>et al.</i>	Circulation (2001)
アスベスト肺	Leonard, S.S. <i>et al.</i>	Mol. Cell. Biochem.(2002)
アンモニア惹起胃潰瘍	Kasazaki, K. <i>et al.</i>	Free Radic. Res.(2003)
脳虚血-再灌流障害	Yamato, M. <i>et al.</i>	Free Radic. Biol. Med.(2003)
ストローク/脳卒中誘発糖尿病	Matsumoto, S. <i>et al.</i>	Free Radic. Res.(2003)
トリニトロベンゼン誘発大腸炎	Togashi, H. <i>et al.</i>	Gut(2003)
水浸拘束惹起胃潰瘍	Yasukawa, K. <i>et al.</i>	Free Radic. Res.(2004)
グリセロールベンゾイル誘発過敏症	Takeshita, K. <i>et al.</i>	J. Invest. Dermatol. (2004)
肥満症(ob/obマウス、Zuckerラット)	Sonta T. <i>et al.</i>	Free Radic. Biol. Med.(2004)
ストローク/脳卒中誘発糖尿病	Tsubouchi H. <i>et al.</i>	Free Radic. Biol. Med.(2005)
ディーゼル粒子惹起肺障害(チオレドキシン-11による阻害)	Kaimul Ahsan, M. <i>et al.</i>	Free Radic. Biol. Med.(2005)
インドメタシン惹起胃潰瘍	Utsumi, H. <i>et al.</i>	J. Pharmacol. Ther. Exp. (2005)
アジュバンド惹起関節炎	Yamada, K. <i>et al.</i>	Free Radic. Res. (2006)
ジェチルニトロソアミン誘発肝ガン	Yamada, K. <i>et al.</i>	Free Radic. Biol. Med. (2006)
糖尿病性眼疾患	Yamato M. <i>et al.</i>	Antioxid. Redox Signal. (2007)
移植ガン	Ichikawa K. <i>et al.</i>	Antioxid. Redox Signal. (2007)
心不全	Tsutsumi T. <i>et al.</i>	Cardiovasc. Res. (2008)

3. オーバーハウザー MRI を用いた生体機能イメージング

3.1 オーバーハウザー MRI 画像化法

「オーバーハウザー効果」は NMR で NOE (Nuclear Overhauser Effect) として汎用されているが、Overhauser 博士の発見は、「フリーラジカルの電子スピンを ESR 遷移させ、電子スピンと核スピンの双極子相互作用により核スピンの偏極する現象」で

ある⁽¹⁰⁾。1988年にLurieらは、このオーバーハウザー効果を利用したMRI (PEDRI; Proton Electron Double Resonance ImagingないしOMRI; Overhauser Effect Magnetic Resonance Imagingと呼ばれている)、即ち、水分子近傍のフリーラジカルを励起させることで増幅したプロトン信号をMRIで画像化する方法を発表した⁽¹¹⁾。Figure 1に示すように、熱平衡状態では、基底状態と励起状態にある核スピンの比はボルツマン分布に従い、例えば1テスラMRI装置の場合、基底状態の核スピンの対する励起状態の核スピンの割合は0.999993408になる。この通常の核スピンのボルツマン分布と比較し、最大(理論値)で330倍に核スピン偏極が増強される。すなわち通常のMRI測定に比べ、330倍(理論値)の高感度化を図ることができる。Figure 2AはPhilips社が試作したOMRI装置(世界で4台設置: スウェーデン・Nycomed Innnovation AB, ドイツ・Rhein-Ahr-Campus Remagen, アメリカ・National Cancer Institute, 日本・九州大学)で、ESRIに較べて数段高い空間分解能を持ち、短時間測定が可能である。また我々も独自にOMRI装置の開発に成功し、OMRI画像の取得に成功している(Figure 2B)⁽¹²⁾。これらのOMRI装置を用いてマウスに投与したトリアルルメチルラジカル⁽¹³⁾、あるいはニトロキシラジカル⁽¹⁴⁾の体内分布、または腫瘍組織中酸素濃度⁽¹⁵⁾や透過性の同時検出⁽¹⁶⁾の画像解析が報告されている。我々はOMRI装置を導入する際に、異なる核種のラジカルを同時分離画像化する方法をPhilips社に提案し測定シーケンスとして組み込んだ。この方法は後述するように組織あるいは細胞の内外のレドックス反応を酸化と還元に分けて同時画像解析でき、より詳細に疾患の成因を解明することが可能である。またアスコルビン酸との反応性を制御する新たなニトロキシラジカルを合成を進めることで、OMRIを用いた生体レドックス変動のより詳細な解析が期待されている^(17,18)。

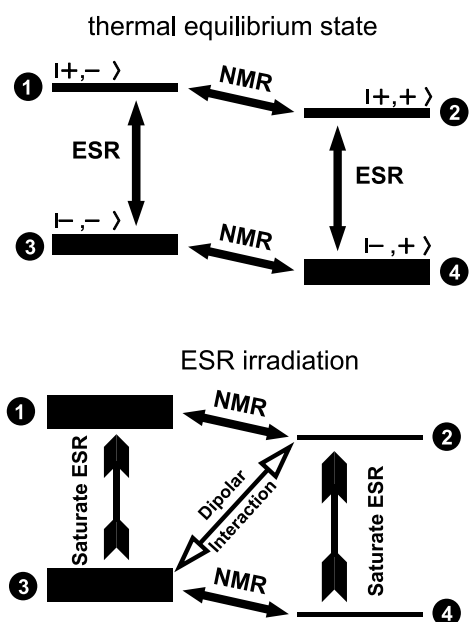


Fig. 1. Principle of Overhauser effect

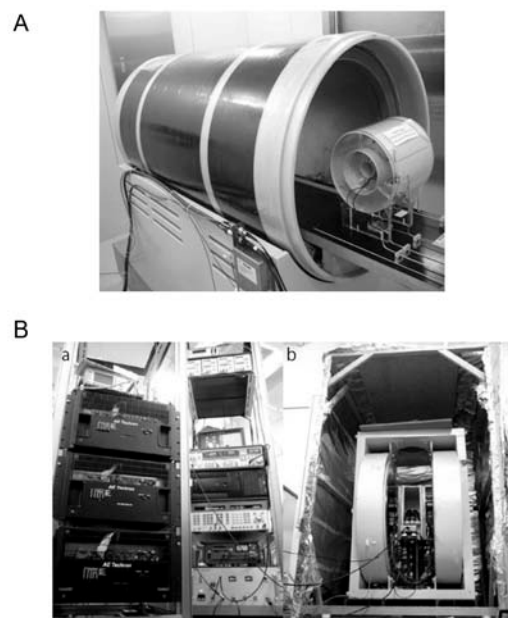


Fig. 2. Pictures of OMRI systems A) OMRI system by Philips Inc. and B) home-built OMRI system

^{14}N , ^{15}N の核スピンはそれぞれ1と1/2で、 ^{14}N , ^{15}N 標識ニトロキシラジカルESRスペクトルはFigure 3aに示すように、 ^{14}N で3本、 ^{15}N で2本となり、共鳴磁場が異なる。従って、オーバーハウザー効果によるプロトンの動的核スピン偏極を惹起させる際に異なった共鳴磁場でESR励起を行えば、 ^{14}N , ^{15}N 標識ニトロキシラジカルを区別して画像化が出来ることが期待される。そこで、Philips社のOMRI装置を導入するに際して、異なる核種のラジカルを同時分離画像化することを目的としFigure 3bに示すOMRIシーケンスをPhilips社に提案した。即ち、OMRIではESR励起とMRIパルスエンコード検出を交互に行うことでラジカルと相互作用している水分子の動的核スピン偏極画像を得ているが、ここでMRIパルスエンコード検出毎に ^{14}N , ^{15}N の核種で交互にESR励起を行うことで、両方のプローブを同時に画像化する方法である。

この方法を膜透過性の異なるニトロキシルプローブに応用すると、膜内外でのレドックス状態を同時分離可視化できる。膜透過プローブ ^{14}N -MC-PROXYLと非膜透過プローブ ^{15}N -carboxy-PROXYLの ^{14}N ないし ^{15}N 標識体を合成し、Figure 4(c)のように、アスコルビン酸封入リポソームと混和し、 ^{14}N と ^{15}N プローブを同時に可視化した。その結果、膜透過プローブ ^{14}N -MC-PROXYLと非膜透過プローブ ^{15}N -carboxy-PROXYLが同時分離した画像が得られ、経時的に得た画像輝度は膜透過プローブ ^{14}N -MC-PROXYL (Figure 4(b))で徐々に減衰したが非膜透過プローブ ^{15}N -carboxy-PROXYL (Figure 4(a))では全く変化しなかった。これは、膜透過性プローブがリポソーム内に侵入しアスコルビン酸によりヒドロキシルアミンに還元されることで常磁性を失ったことによるもので、本手法によりナノメートルスケールである細胞膜の内側と外側でのレドックス状態を区別

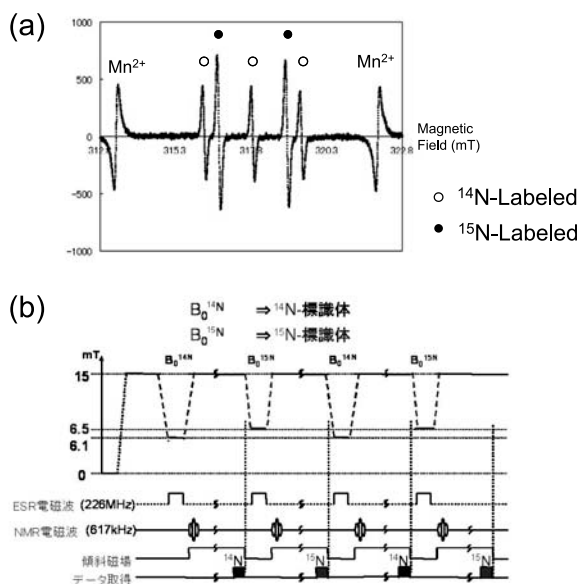


Fig. 3. New pulse sequences for simultaneous imaging using OMRI. (a) EPR spectra of ^{14}N -, ^{15}N -nitroxyl radical. (b) Field-cycle OMRI pulse sequence for the simultaneous separate imaging of ^{14}N - and ^{15}N -nitroxyl radicals. The OMRI experiments were performed on a custom-built (Philips Research Laboratories, Hamburg, Germany) human whole-body magnet (79 cm diameter; 125 cm length). The resonator assembly consists of the NMR transmit saddle coil (25 cm diameter, 23 cm length), a solenoidal receive coil (5 cm i.d., 60mm length), and the ESR saddle coil (13.5 cm diameter, 23.5 cm length). The pulse sequence started with the ramping B_0 ESR, which was followed by switching on the ESR irradiation (220.6 MHz), and the associated field gradients were turned on under B_0 NMR. Typical scan

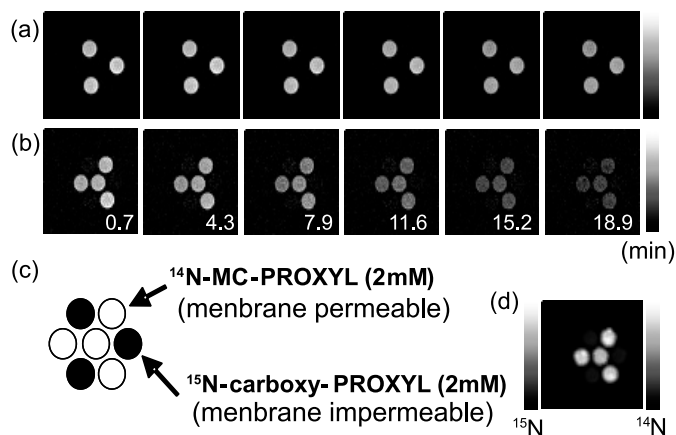


Fig. 4. Simultaneous and time-dependent OMRI of ^{15}N -carboxy-PROXYL and ^{14}N -MC-PROXYL in liposomes encapsulating Ascorbic acid (100 mM). Seven phantom tubes containing ^{14}N -labeled and ^{15}N -labeled nitroxyl radicals in the presence and the absence of liposomes, which are shown in Fig. 4c, were placed in the OMRI so that images of ^{15}N - and ^{14}N -enhanced images were obtained simultaneously at the times shown in the figures. The presence of ^{15}N -carboxy-PROXYL was clearly shown by the red color, and ^{14}N -MC-PROXYL by the blue color. (FOV, 48×48 mm; matrix, 64×64 ; slice thickness, 10 mm; TR/TE/TESR, 1200/25/600 ms.)

して視覚化したことを意味しており、本手法が広義の生体レドックス分子イメージングとして有用であることを示している⁽¹⁹⁾。

Figure 5には ^{14}N と ^{15}N プローブを用いた同時分離画像化の動物実験の結果を示している。Figure 5Aは ^{15}N でラベルしたoxo-TEMPOを経口投与、Figure 5Bは ^{14}N のCarbamoyl-PROXYLを尾静脈内投与後、同時撮像した結果を示している。ここで胃と心臓、膀胱に関心領域を設定すると、胃では ^{15}N -oxo-TEMPOは安定で、ほぼ一定の画像強度を示した。また膀胱では尾静脈内投与された ^{14}N -Carbamoyl-PROXYLの画像強度が経時的に上昇し膀胱に排泄されることがわかる。これらの結果より、2つの性質の異なるニトロキシルラジカルを追跡し、異なる変化を同時に解析することができることが示された。

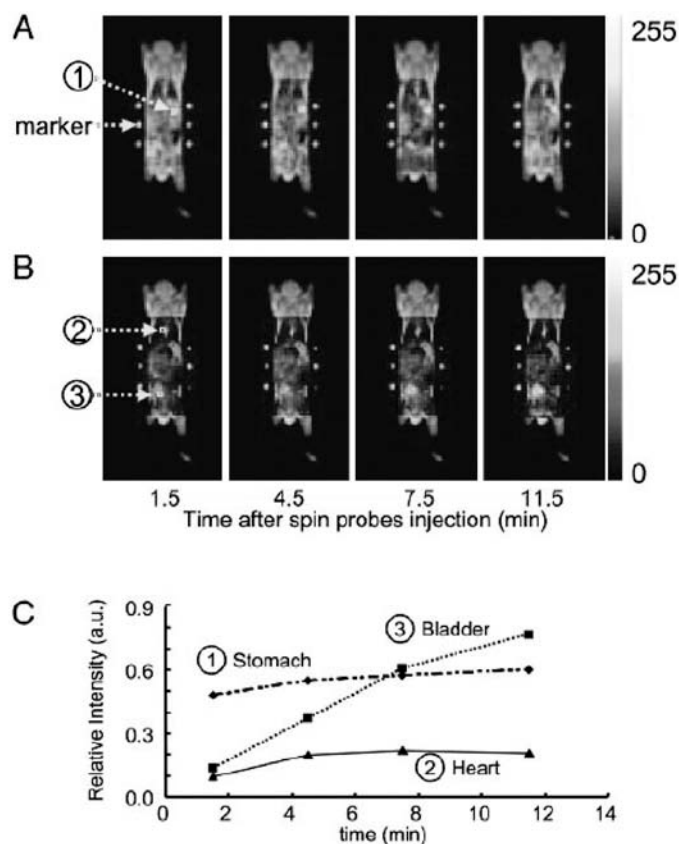


Fig. 5. Pharmacokinetic images of ^{14}N - and ^{15}N -nitroxyl probes after injection through different routes. The time-dependent simultaneous images of ^{15}N -oxo-TEMPO (A) and ^{14}N -carbamoyl-PROXYL (B) in a living mouse after intragastric and i.v. injection, respectively, and the time course of image intensities at stomach, heart, and bladder (C). Into a living mouse, 200 μl of ^{15}N -oxo-TEMPO (10 mM) was administered intragastrically, and then 200 μl of ^{14}N -carbamoyl-PROXYL (300 mM) i.v. Immediately after administrations, OMRI images of ^{14}N - and ^{15}N -nitroxyl radicals were obtained. T1-weighted MRI was performed on a clinical MRI instrument, and the OMRI images were superimposed with the MRI image by fitting the position of the markers (six capillaries containing either radical) (FOV, 48×48 mm; matrix, 64×64 ; slice thickness, 30 mm; TR/TE/TESR, 1,100 ms/25 ms/550 ms).

3.2 OMRIを用いた脳機能イメージング

脳梗塞の治療時の血流再開通に伴い、活性酸素種が誘導され障害を惹起する虚血再環流障害が問題となっている。大和らは⁽²⁰⁾ラット脳虚血再環流モデルを用いたOMRI画像解析により、虚血再灌流時に脳内にレドックス変動が惹起されることを明らかにしている。Figure 6に、虚血1時間、再灌流24時間群の結果を示している。血液脳関門を通過できるニトロキシルプローブであるMC-PROXYLを再灌流24時間後のラットに尾静脈内投与し、その直後からOMRI解析を開始した。その結果、Figure 6に示すように、脳実質での画像輝度が上昇し、その後、その強度は時間とともに減少した。この時、虚血半球における画像強度の消失速度は非虚血半球に比べ有意に低下した(Figure 6C)。またこの時のMC-PROXYLの脳内分布量(酸化型+還元型)については、両半球に違いは認められなかったことから、減衰速度の低下がMC-PROXYLの還元速度の低下に起因するものであることが示唆されている。また脳虚血再灌流後の減衰速度遅延に、脳内還元系が関与するか否かについて検討するために、脳内のミトコンドリア電子伝達系酵素活性及び低分子還元物質の測定を行っている。ミトコンドリア電子伝達系酵素活性については、再灌流3時間では両半球に違いは認め

られなかったが、再灌流24時間後では、複合体IIの酵素活性が虚血半球にて低下していた(Figure 7)。また、グルタチオンやアスコルビン酸等の体内に豊富に存在する低分子還元物質については、再灌流3時間後でグルタチオン濃度の低下が認められ、再灌流24時間後にはアスコルビン酸の低下が認められた。以上の結果から、OMRIで視覚化されたレドックス変動は、脳虚血再灌流により惹起されたミトコンドリア機能不全や脳内還元物質の低下に起因する可能性が認められている。

3.3 今後の展開：メタボロミクス解析技術との融合解析へ

これまでに前述してきた通り、OMRIを用いることでレドックス変動を非侵襲的に可視化することが可能である。これら生体計測で得られた機能変動に関与する生体内分子・代謝物を明らかにすることができれば、レドックス変動を伴う疾患に対する治療や病態メカニズム解明に役立つと考えられる。そこで我々は“生体組織切片を用いる質量分析イメージング技術”に着目した解析を展開している。

近年飛躍的に向上しつつある質量分析計やNMRを用いるメタボロミクス解析技術は、測定における種々の制約により、代謝物の抽出・濃縮が不可欠であった。したがって結果的に得ら

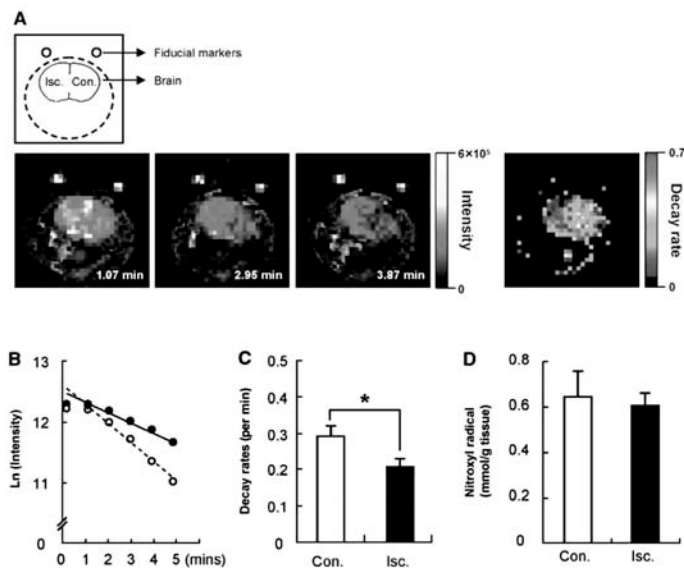


Fig. 6. OMRI images and signal decay rate of methoxycarbonyl-PROXYL in the brain after 24 h of reperfusion following 1 h of MCAO. (A) Time dependent OMRI image of methoxycarbonyl-PROXYL in the head region, and the image showing the decay rates. (B) The signal decay curves obtained from the continuous images of the contralateral hemisphere (open circles) and ischemic hemisphere (closed circles) images. (C) The signal decay rates of the contralateral hemisphere (open bar) and ischemic hemisphere (closed bar). (D) Quantification of the total methoxycarbonyl-PROXYL in the contralateral hemisphere (open bar) and ischemic hemisphere (closed bar) using X-band EPR. Each value represents the mean $\pm$ s.d. of four rats. * $P < 0.05$ compared with the contralateral hemisphere.

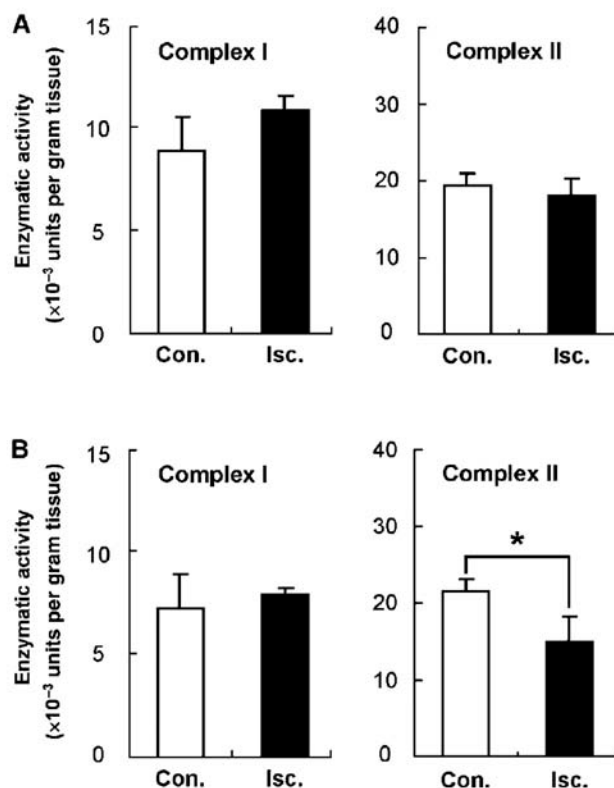


Fig. 7. Estimation of the mitochondrial complexes I and II activities after 3 h (A) and 24 h (B) of reperfusion following MCAO. Open and closed bars represent the enzymatic activity in the contralateral and ischemic hemispheres, respectively. Each value represents the mean $\pm$ s.d. of five rats. * $P < 0.05$ compared with the contralateral hemisphere.

れる情報は生体組織全体の平均値となり、局所的なメタボローム変動情報は完全に消失してしまう。近年、三浦らは⁽²¹⁾切片をそのまま質量分析計で可視化する内在性微量代謝物の質量分析イメージング (Mass Spectrometry Imaging) 法を構築し、前述したラット虚血再灌流モデルに応用している。

Figure 8には虚血・再灌流処置後の各時間における TTC 染色像と N-アセチルアスパラギン酸の MS イメージング画像を示している。再灌流 24 時間後の TTC 染色像で明確な組織障害部位が観測されたのに対し、MS イメージングでは N-アセチルアスパラギン酸の分布が再灌流後 3 時間においてすでに変化していることを示している。また Figure 9 には得られた MS イメージング画像をエネルギー産生系である解糖系と TCA サイクル

に当てはめて解析した結果を示している。これらの結果より、脳虚血再灌流により種々の代謝物の脳実質内での分布が時間と共に変化することが明らかとなった。特に障害進展初期の線状体においてクエン酸が高蓄積し、これはミトコンドリアにおける呼吸鎖のオーバーフローに伴うレドックス反応の亢進が原因であると考えられている。このように MS イメージング技術を用いることで、各時間における内在性代謝物の網羅的な変化を二次元情報と共に可視化することが可能である。

我々は今後、OMRI を用いた生体機能イメージングにこれら MS イメージングや LC-MS などメタボロミクス解析技術を加え、様々なレドックス疾患における詳細なメカニズム解明へと展開していきたいと考えている。

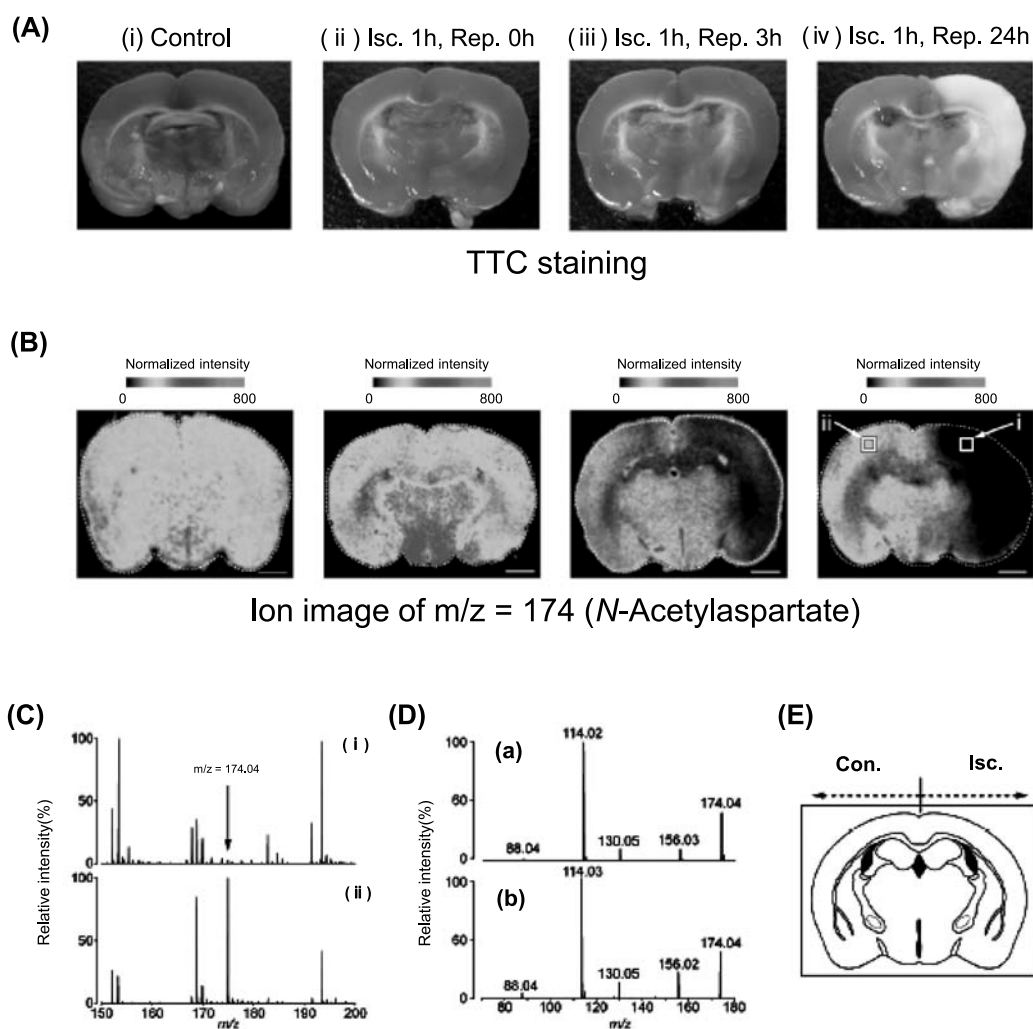


Fig. 8. Visualization of the cerebral infarct region of an ischemia-reperfusion rat model by in situ metabolite imaging. (A) Two millimeter thick sections were obtained using a brain slicer and stained with triphenyltetrazolium chloride (TTC). The rat brains were from (i) control or were acquired at (ii) 0 h, (iii) 3 h, and (iv) 24 h of reperfusion (Rep.) following 1 h of MCAO (Isc.). (B) MS imaging of the spatial distribution of m/z) 174.04 in MCAO rat brain. (C) Comparison of averaged mass spectra in selected cerebral cortex (CTX) areas, after 24 h reperfusion in the b (i) ischemic and b (ii) contralateral hemisphere. (D) Identification of MS peak of m/z) 174.04 as N-acetylaspartate by comparing MS/MS data. The MS/MS spectrum of N-acetylaspartate was acquired from the tissue sample (a) and standard sample (b). (E) A schematic illustration represents the structure of a coronally sectioned brain. Con. indicates contralateral hemisphere.

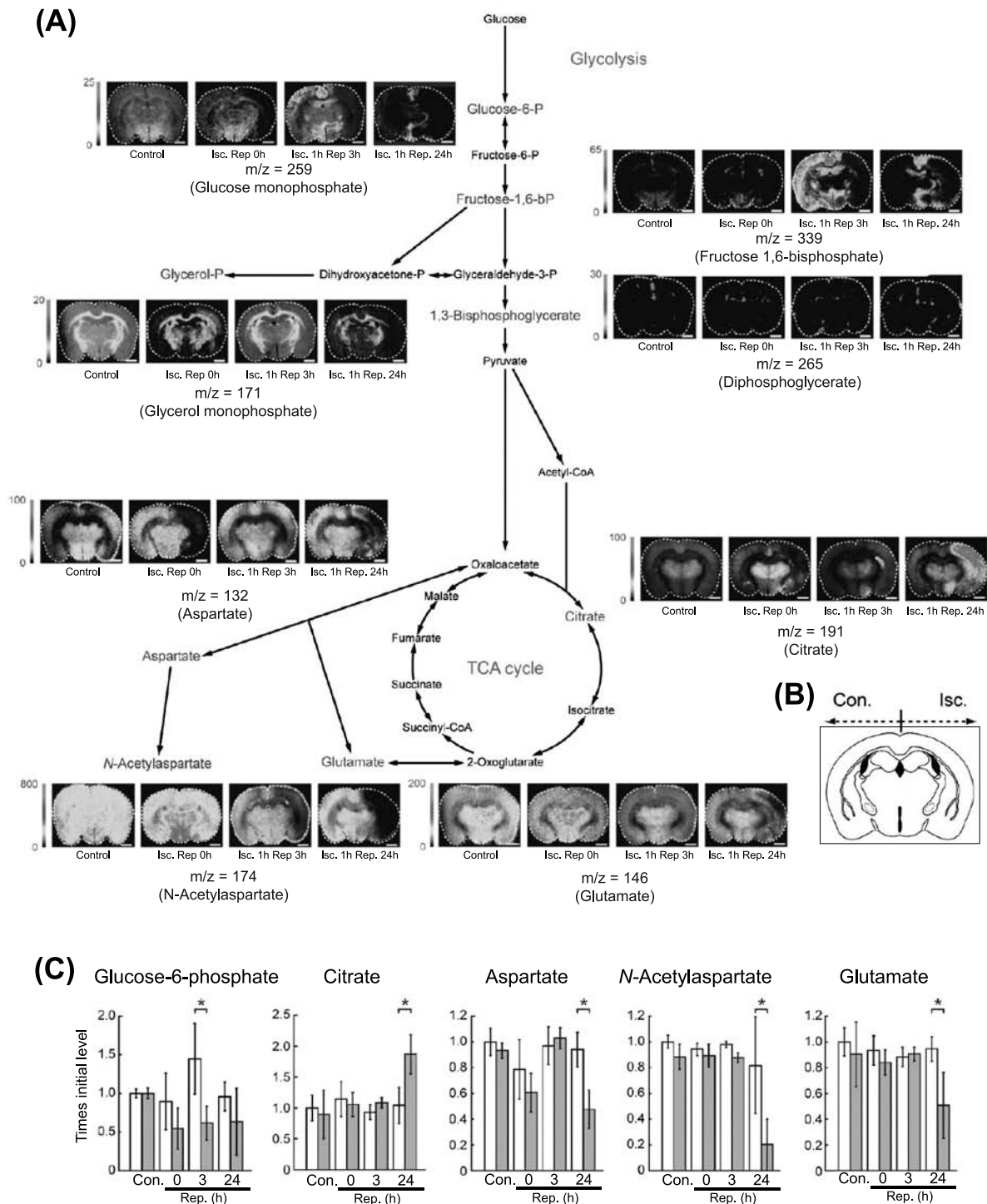


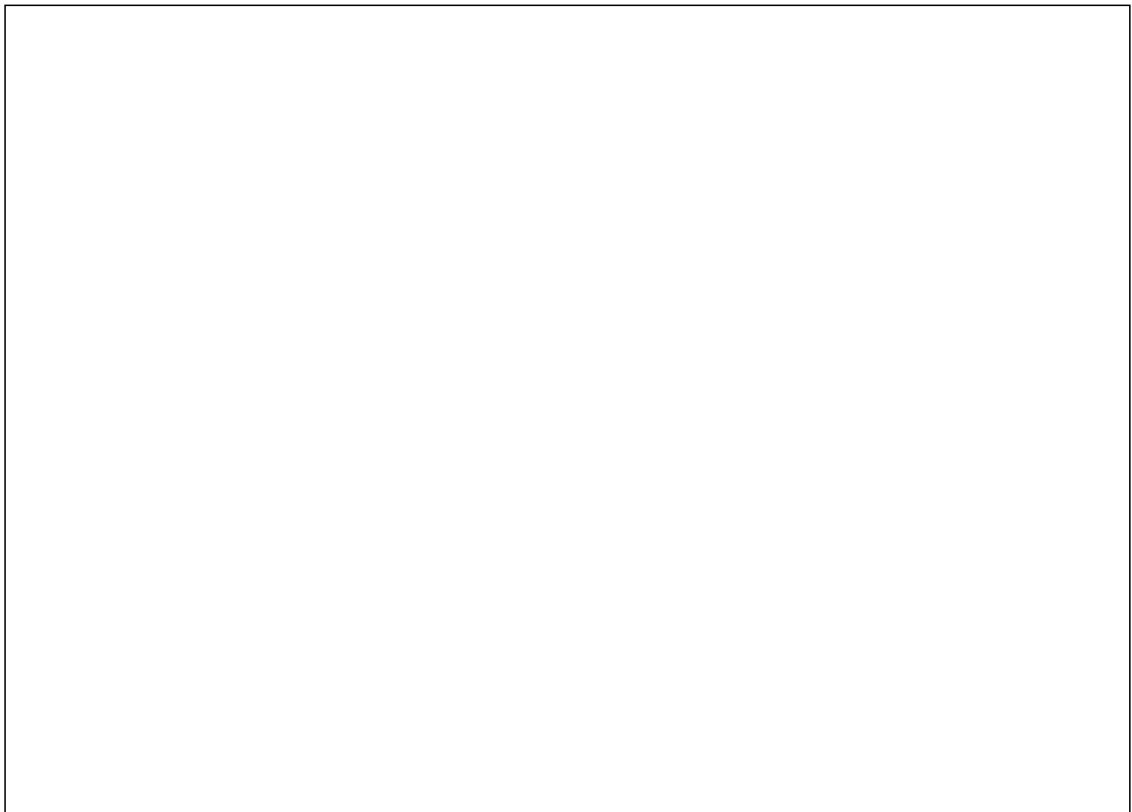
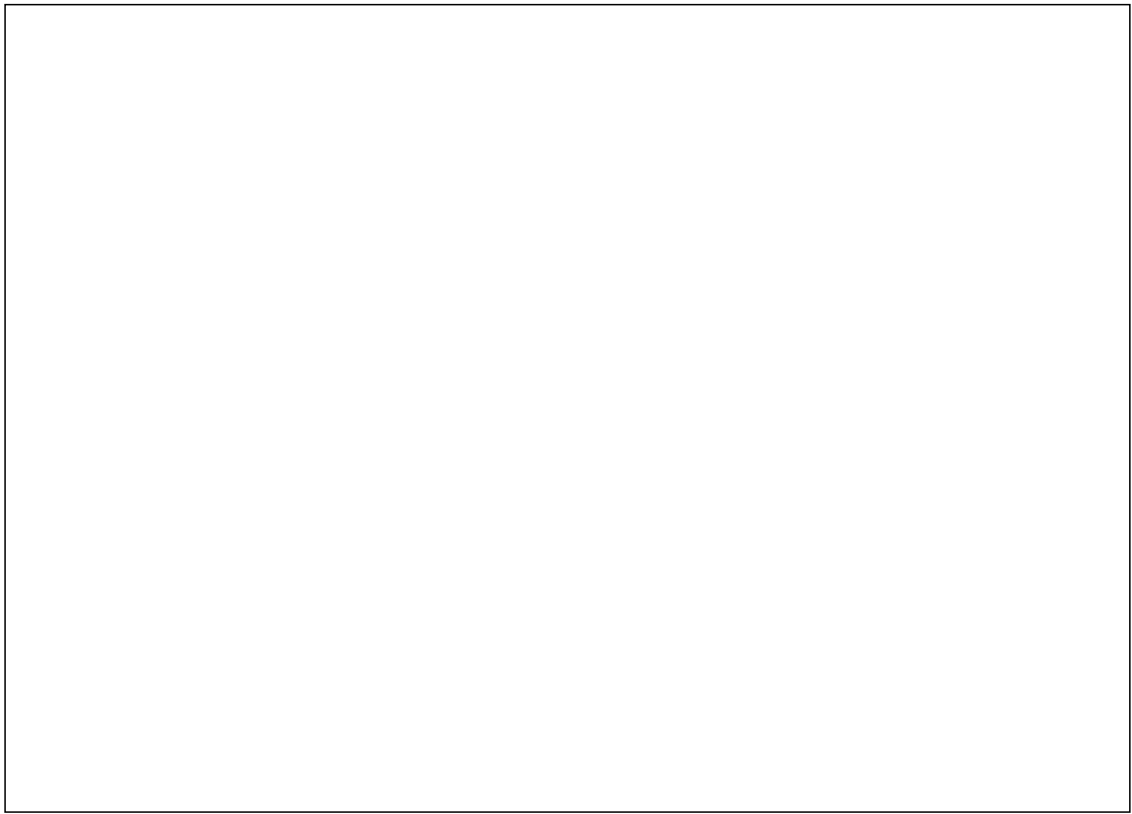
Fig. 9. In situ metabolic pathway imaging visualizes drastic changes of spatiotemporal metabolite distribution in MCAO rat brain. Wistar rat brains of control (no operation) or from rats after various periods of reperfusion following 1 h of MCAO were extirpated and immediately frozen under -80°C . Coronally sectioned brain slices ($10\ \mu\text{m}$ thickness) were then used for in situ metabolite imaging. Mass imaging data were acquired in negative ionization mode with $50\ \mu\text{m}$ spatial resolution ($14\ 000\ \mu\text{m} \times 11\ 000\ \mu\text{m}$, 10 shots/data point). All imaging data were normalized with the average mass spectrum for quantitative comparison of the concentration of each metabolite at different times. (a) These data were put on the central metabolic pathway map. (b) A schematic illustration represents the structure of coronally sectioned brain. (c) Relative changes in concentrations of metabolites extracted from whole CTX. Data is shown as the mean (SD) ($n = 5$) and represents the relative concentration of each condition to the concentration of contralateral CTX in control (Con.). Asterisk mark indicates significant differences ($P < 0.05$) between contralateral (open bar) and ischemic (closed bar) CTXs.

謝辞

本研究は、文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム、日本学術振興会 (JSPS) の基盤研究 (A)、先端研究拠点事業、科学技術振興機構 (JST) の先端計測分析技術・機器開発プログラムなどの支援により行われた。記して謝意を表する。

引用文献

1. Utsumi H, Yasukawa K, Soeda T, Yamada K, Shigemi R, Yao T, et al. Noninvasive mapping of reactive oxygen species by in vivo electron spin resonance spectroscopy in indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317: 228-235.
2. Utsumi H, Takeshita K, Ichikawa K, Matsumoto K, Chung YS, Han JY, et al. In vivo ESR measurements of free radical reactions in living mice. *J Toxicol Sci* 1996; 21: 293-295.
3. Kuppusamy P, Li H, Ilangoan G, Cardounel AJ, Zweier JL, Yamada K, et al. Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels. *Cancer Res* 2002; 62: 307-312.
4. Ichikawa K, Sakabe E, Kuninobu K, Yamori T, Tsuruo T, Yao T, et al. Application of in vivo ESR/spin-probe technique to monitor tumor in vivo in mouse footpad. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1699-1707.
5. Yasukawa K, Miyakawa R, Yao T, Tsuneyoshi M, Utsumi H. Non-invasive monitoring of redox status in mice with dextran sodium sulphate-induced colitis. *Free Radic Res* 2009; 43: 505-513.
6. Rozantsev EG. Synthesis of some stable radicals and the most important intermediates. New York: Plenum Press 1970; 203-246.
7. Asmus KD, Nigam S, Willson RL. Kinetics of Nitroxyl Radical Reactions a Pulse-Radiolysis Conductivity Study. *Intern J Radiation Biol* 1976; 29: 211-219.
8. Finkelstein ER, G. M.; Rauckman, E. J. Superoxide-Dependent Reduction of Nitroxides by Thiols. *Biochim Biophys Acta* 1984; 802: 90-98.
9. Kocherginsky N. Nitroxide Spin Labels: Reactions in Biology and Chemistry. CRC Press 1995; 27-66.
10. Overhauser WA. Polarization of Nuclei in Metals. *Phys Rev* 1953; 92: 411-412.
11. Lurie DJ, Bussell DM, Bell LH. Proton-Electron Double Magnetic Resonance Imaging of Free Radical Solutions. *J Magn Resonance* 1988; 76: 366-370.
12. Naganuma T. Development of OMRI system for high resolution functional imaging. Master thesis, Kyushu University, Japan 2007.
13. Li H, Deng Y, He G, Kuppusamy P, Lurie DJ, Zweier JL. Proton electron double resonance imaging of the in vivo distribution and clearance of a triaryl methyl radical in mice. *Magn Reson Med* 2002; 48: 530-534.
14. Li H, He G, Deng Y, Kuppusamy P, Zweier JL. In vivo proton electron double resonance imaging of the distribution and clearance of nitroxide radicals in mice. *Magn Reson Med* 2006; 55: 669-675.
15. Krishna MC, English S, Yamada K, Yoo J, Murugesan R, Devasahayam N, et al. Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximetry: coregistration of tumor anatomy and tissue oxygen concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 19; 99: 2216-2221.
16. Matsumoto S, Yasui H, Batra S, Kinoshita Y, Bernardo M, Munasinghe JP, et al. Simultaneous imaging of tumor oxygenation and microvascular permeability using Overhauser enhanced MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 17898-17903.
17. Yamada K, Kinoshita Y, Yamasaki T, Sadasue H, Mito F, Nagai M, et al. Synthesis of nitroxyl radicals for Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging. *Arch Pharm (Weinheim)* 2008; 341: 548-553.
18. Kinoshita Y, Yamada K, Yamasaki T, Mito F, Yamato M, Kosem N, et al. In vivo evaluation of novel nitroxyl radicals with reduction stability. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1703-1709.
19. Utsumi H, Yamada K, Ichikawa K, Sakai K, Kinoshita Y, Matsumoto S, et al. Simultaneous molecular imaging of redox reactions monitored by Overhauser-enhanced MRI with ¹⁴N- and ¹⁵N-labeled nitroxyl radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 10: 1463-1468.
20. Yamato M, Shiba T, Yamada K, Watanabe T, Utsumi H. Noninvasive assessment of the brain redox status after transient middle cerebral artery occlusion using Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 1655-1664.
21. Miura D, Fujimura Y, Yamato M, Hyodo F, Utsumi H, Tachibana H, et al. Ultrahighly sensitive in situ metabolomic imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviors. *Anal Chem* 2010; 82: 9789-9796.



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.



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

The Journal's purpose is to publish research and related articles contributing to 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):

ii) 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: Artificial Blood Editorial Office
The Society of Blood Substitutes, Japan
Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery,
Keio University, School of Medicine
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
Tel: +81-3-5363-3493 Fax: +81-3-5363-3499
E-mail : amorjsbs@sc.itc.keio.ac.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), ポリグラフィシステム (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

〒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

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部 宛

電話: 03-5363-3493, FAX: 03-5363-3499

E-mail: amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

人工血液

日本血液代替物学会会誌

Artificial Blood

The Official Journal of The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会

会長 小林 紘一 殿

To: Dr. Koichi Kobayashi

President

The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」に投稿した論文

表題

Manuscript Title:

につきまして、倫理規定に準拠した内容であること、また、共著者の全員が内容を確認していることを誓約いたします。なお、掲載された論文の著作権は、貴学会に帰属することを認めます。

I attest that the content of the above manuscript, submitted for publication in *Artificial Blood*, the journal of the Society of Blood Substitutes, Japan, conforms to ethical standards and has been confirmed by all coauthors. We acknowledge that copyright will be held by the Society.

平成 年 月 日

Date:

代表著者（署名）

Corresponding Author (Signature) _____

連絡先

Contact Address:

（本用紙はコピーしたものを使用されても結構です。）

This form may be photocopied for use.

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部

〒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 E-mail : amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

Artificial Blood Editorial Office

The Society of Blood Substitutes, Japan

Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery, Keio University, School of Medicine

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Tel: +81-3-5363-3493 Fax: +81-3-5363-3499 E-mail : amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

●編集後記●

高折益彦先生（東宝塚さとう病院）からは、人工赤血球の臨床第1相試験プロトコールについてご提案を頂いた。我が国でヘモグロビンを用いた人工赤血球の研究が始まって久しいが、未だに臨床試験が始まっていないのは、臨床現場に携わる医師や、患者さんにとっては何とも歯がゆいことであろう。10月に札幌で開催される年次大会でも「血液代替物実用化を促進させよう」というテーマで議論される。早期にGMP製造を確立させて、ご提案のプロトコールに沿った臨床試験にこぎつけたいものである。鈴木壱知先生ほか（獨協医大）からは、アルブミンの質的問題についての話題提供である。国内産が外国産に比較して質的にまた性能的に優れていることは、重要な知見である。平田圭一先生ほか（帝京大）からは、臨床試験が進んでい

るPEG修飾リポソーム製剤について、また兵藤文紀先生ほか（九大）からは、リポソームにニトロキシラジカルを担持させたプローブを用いる生体レドックス疾患の可視化についてお話頂いた。現在研究が進んでいる人工赤血球もリポソーム製剤の一つであり、学ぶ事は多い。今回の総説計3件は、昨年熊本で開催された第17回日本代替物学会年次大会（大会長：小田切優樹先生）の講演者をお願いして御寄稿頂いたものです。本誌は慢性的に投稿数が不足しております。会員の皆様には、是非とも御寄稿・話題提供に御協力を頂きたく、よろしくお願い申し上げます。

（酒井 宏水）

編集委員会

●酒井 宏水 (委員長), 東 寛, 武岡 真司, 堀之内 宏久, 棟近 公司, 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.19 (1) 2011年8月18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

〒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

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

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