

し、心筋に分化したのであろうとされた。しかしその後、細胞融合という現象が報告され (図 1.1.3)、造血幹細胞のみかけの多能性に関しては細胞融合が原因ではないかという否定的な見解が多く示された⁸⁾。

われわれの GFP トランスジェニックマウスを用いた骨髄移植モデルによる検討でも、造血幹細胞の多能性に関しては否定的な所見が得られている (図 1.1.4)。しかし、間葉系幹細胞に関しては *in vitro* の実験同様、*in vivo* でも心筋細胞に分化する所見が得られており、骨髄由来細胞の多能性は間葉系幹細胞に起因するものと考えられる。

最近 2 年ぐらいのトピックは骨髄内の MAPC 細胞 (multipotent adult progenitor cell) であろう⁹⁾。MAPC 細胞はミネソタ大学の Verfeillie 教授らのグループが報告した多分化能を有する細胞で、あらゆる種類の細胞に分化誘導可能な細胞であると報告されている¹⁰⁾。MAPC を別のマウスの受精卵の胚盤胞に注射してキメラマウスを形成させると、MAPC は胚性幹細胞と同様にほぼすべての細胞に分化することが報告された。しかし、MAPC の培養法は極めて細胞密度の薄い条件で培養しないと細胞が分化するとされ、再現性も乏しいことから、細胞を *in vitro* で長期間培養することによるアーチファクトではないかとする声もある。MAPC に関しては今後の研究をみた上で慎重に判断されるべきであろう。

1.2.3 心筋内の幹細胞

昨年後半に米国で相次いで成体心臓内に存在する多能性幹細胞の存在が報告された。Anversa らは心筋細胞中の SCF (stem cell factor) 受容体である c-kit 陽性の小型の細胞を単離し培養すると、心筋、平滑筋、内皮細胞に分化すると報告した。この c-kit 陽性細胞は

クローナルに増殖し、心筋梗塞時には梗塞巣で心筋細胞に分化し、梗塞巣の修復に関与しているのではないかとしている¹¹⁾。また、この細胞は心尖部と心房内に散在して存在し、心筋梗塞時には梗塞巣に移動するとしている。これに対し Schneider らは成体心組織に Sca-1 (stem cell antigen-1) 陽性の細胞が存在し、この細胞は多分化能をもつわけではないが DNA 脱メチル化剤の 5-azacytidine を用いることにより心筋細胞に分化が可能であるとし、心筋細胞の progenitor (前駆細胞) ではないかとしている¹²⁾。この Sca-1 陽性細胞は尾静脈より注射すると心筋梗塞部に homing するという。さらに Hierlihy らは心臓内に存在する SP (side population) 細胞を採取してくると一部の細胞が心筋細胞に分化すると報告した¹³⁾ (図 1.1.5)。SP 細胞は Mulligan らが骨髄の造血幹細胞を濃縮する方法として開発したもので、DNA 結合色素の Hoechst33342 の細胞外への汲み出し能力を指標として幹細胞を分離する方法である。Hoechst33342 を細胞外に汲み出すポンプは ABC トランスポーターである MRD1 が関与しているとされ、この蛋白を発現する細胞に幹細胞として

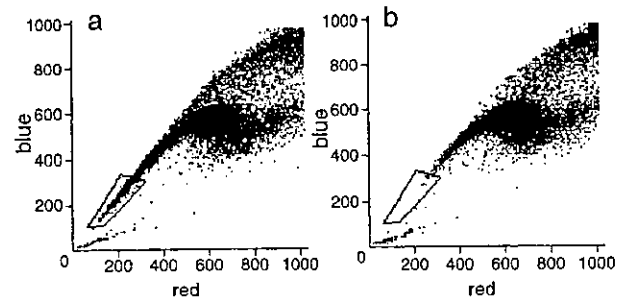


図 1.1.5 心臓由来の SP 細胞分画
a: reserpine (-) b: reserpine (+)

	c-kit	MRD1	Sca-1
構造	<p>免疫グロブリン様ドメイン チロシンキナーゼドメイン</p>	<p>細胞外領域 細胞内領域 ATP</p>	<p>PtdIns anchor</p>
分布	メラノサイト、マスト細胞、生殖細胞、幹細胞	肝細胞、胆管細胞、brush border cells 腎尿細管細胞、癌細胞、脳血管内皮細胞、幹細胞	血管壁、腎皮質細胞、胸腺、脾臓、Tリンパ球、幹細胞
機能	増殖、遊走、分化、分泌	膜に存在する排出ポンプ、アポトーシスの抑制	細胞接着、シグナル伝達、T細胞活性化

図 1.1.6 c-kit、MDR-1、Sca-1 の各種細胞における構造、機能と分布

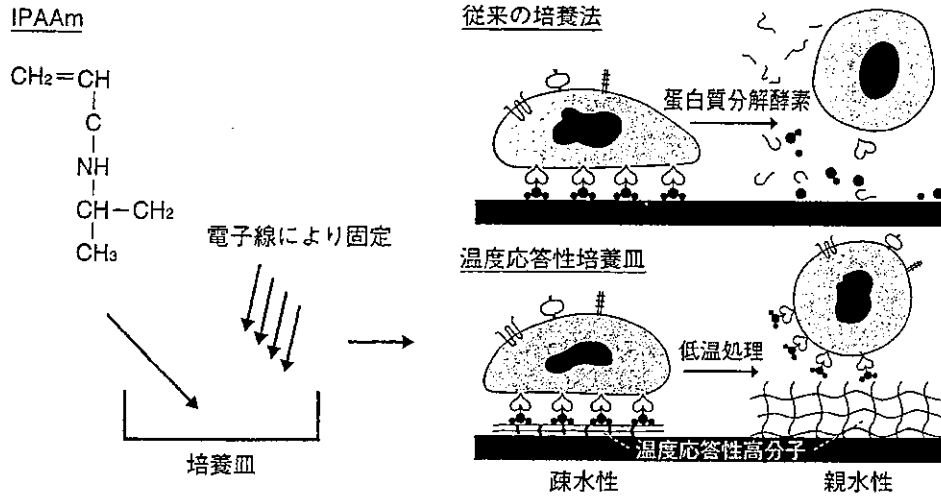


図 1.1.7 東京女子医科大学岡野らが開発した温度感受性培養皿の構造と機能

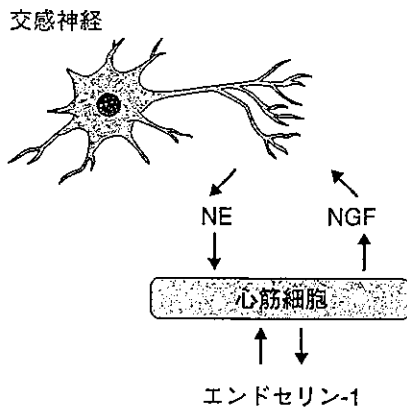


図 1.1.8 心臓と交感神経の関係

心筋細胞自身が分泌したエンドセリン-1が autocrine に心筋細胞に作用し、NGF を分泌する。この NGF が交感神経を呼び込むことにより心臓の交感神経が発達する。

の能力が高いとされる。c-kit、Sca-1、MRD1 自体の構造、機能、発現する細胞をまとめたものを図 1.1.6 に示した。これらの c-kit 陽性細胞、Sca-1 細胞、MRD1 陽性の SP 細胞は一部重複する性質をもつが、基本的には異なる細胞であると思われる、その存在頻度、生体での機能と存在意義は今後の解決すべき問題であろう。

これらの心臓内に存在する幹細胞が心筋細胞として存在するとして、これらを生体外に取り出して大量培養し、*in vitro* で心筋細胞に分化させて、再移植するには *in vitro* での大量培養法の確立と心筋分化誘導法が必要不可欠のものとなる。むしろ、生体内で増殖・分化させる方が現実的である。今後のさらなる研究の発展が期待される。

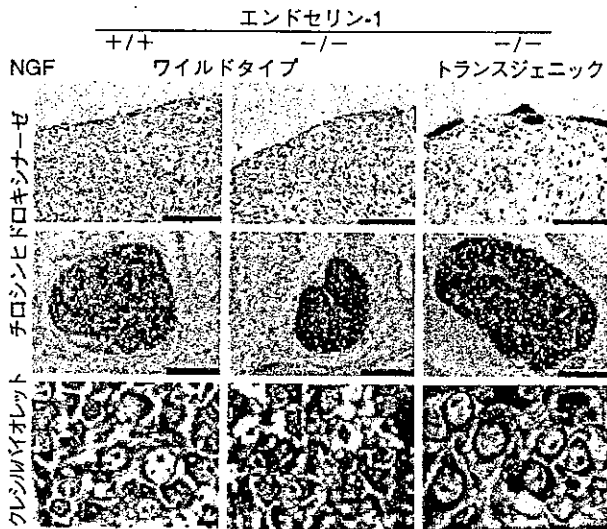


図1.1.9 エンドセリン-1欠損マウスの心臓における交感神経 (口絵3参照)

エンドセリン-1 欠損マウスでは心臓の交感神経が欠損するとともに星状神経節のアポトーシスが観察される。この表現型は心臓特異的に NGF を過剰発現することにより回復する。

1.3 心筋細胞移植の方法

これまでの心臓への(再生)心筋細胞移植は、*in vivo* の心臓に直接注射針で細胞を移植するという方法がとられた(図 1.1.7)。しかし、この方法では移植した細胞の生着率が低く、移植できる細胞の数も限られたものであった。これに対し、東京女子医科大学の Okano らは、培養皿の表面に温度感受性に分子形態が変化し、脂溶性・水溶性を転換させる poly-N-isopropylacryl-amide (PIPAAm) という化合物をコーティングする温度感受性培養皿を作成した¹⁴⁾。この培養皿を用いると培養細胞をシート状に回収することができ、移植に直接用いることができる。Shimizu らはこの培養皿を用いて心筋細胞シートを作成し、ラット皮下に長期間生着し、拍動を続ける層状の心筋組織の開発に成功した¹⁵⁾。Shimizu らの研究成果は心筋細胞の移植法に大きなインパクトを与えた。これまで細胞レベルの再生のみに注目が集められてきたが、細胞レ

ベルから組織レベルの再生を論じる素地を作るものとなったといえよう。組織レベルの再生にはこれ以外にも血管の構築や神経支配も重要な問題であり、今後の研究を待つことになる。

1.4 心臓の交感神経支配の形成

心臓は諸臓器のなかでも唾液腺と並び交感神経の分布密度が高い臓器である。交感神経の刺激により、心臓は心拍数の上昇、心収縮力の増強、刺激伝導速度の増強が起こる。心臓を支配する交感神経は主として星状神経節の神経細胞の支配を受けるが、これまで心臓を支配する交感神経がいかなる機序で形成されるかは解明されてこなかった。われわれの近年の解析では、心臓への交感神経支配は胎生後期に心筋細胞から分泌される神経成長因子 (NGF) を指標に星状神経節から軸索が伸長してくる。そしてこのときに心筋細胞が autocrine に分泌するエンドセリン-1 が心筋細胞自身に作用して ET-A 受容体、 $G_i\beta\gamma$ を介して経路で NGF を分泌させることが明らかとなった (図 1.1.8)¹⁶⁾。そしてこのエンドセリン-1/NGF 経路が存在しない場合には心筋細胞に交感神経がこないだけでなく、星状神経節の交感神経細胞体自身がアポトーシスを起こすことも明らかとなった (図 1.1.9)。心臓移植あるいは再生心筋細胞移植した臓器・組織に再神経支配を行うためには、種々のさらに基礎レベルの研究が必要であろう。

1.5 再生医学の今後

われわれが研究を始めた 10 年前は、心臓の再生などは SF の世界ではないかと考えられていた。しかし、今では骨髄間葉系幹細胞や胚性幹細胞を用いた心筋細胞の再生が可能となり、再生心筋をシート状にした組織レベルでの再生も可能となってきた。もちろんこれだけでは現実の医療にすぐ結びつくものではない。血管構築や神経支配を伴う再生組織の作成にはまだ越えねばならないステップは山ほどあるであろう。過去 100 年間の医学の進歩を顧みるとき、これから先の 100 年後には必ず再生臓器は臨床応用されていると考えられる。子供の頃にみた鉄腕アトムが 2 足歩行するロボットとして現実味を帯びてきた今、再生臓器の具現化もそう遠い将来ではないと確信している。

文献

- 1) 京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターヒト ES 細胞プロジェクト情報公開ホームページ
<http://www.shigen.nig.ac.jp/escell/human/top.jsp>
- 2) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* **108**: 407-414, 2001
- 3) Olson EN: The Path to the Heart and the Road Not Taken. *Science* **291**: 2327-2328, 2001
- 4) Prockop DJ: Adult stem cells gradually come of age. *Nat Biotechnol* **20**: 791-792, 2002
- 5) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* **103**: 697-705, 1999
- 6) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, et al: Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* **68**: 235-244, 2001
- 7) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al: Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* **346**: 5-15, 2002
- 8) Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**: 542-545, 2002
- 9) Reyes M, Verfaillie CM: Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* **938**: 231-233, 2001
- 10) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**(6893): 41-49, 2002
- 11) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**(6): 763-767, 2003
- 12) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al: Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 12313-12318, 2003
- 13) Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, et al: The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* **530**: 239-243, 2002
- 14) Okano T, Yamada N, Sakai H, et al: A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* **27**: 1243-1251, 1993
- 15) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* **90**: e40-48, 2002
- 16) Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, et al: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* **113**: 876-884, 2004

(福田恵一)

4. 増幅臍帯血幹細胞の移植—現状と課題—

東海大学血液・腫瘍・リウマチ内科助教授 安藤 潔
同 教授 堀田知光

key words cord blood, hematopoietic stem cells, ex vivo expansion, cytokines, stromal cells, self-renewal factor, differentiation

動 向

1988年にGluckmanらにより世界で初めて行われた臍帯血移植は、以来現在までに2000例以上施行されている。わが国においても近年急速に移植例が増加し、2001年10月末までに500例を越す非血縁臍帯血移植が行われている¹⁾。臍帯血は採取に際して母親や胎児の負担や危険がなく、従来は廃棄されていたものであり、医療資源の有効活用の面からも好ましい幹細胞供給源である。このため、臍帯血は骨髄、末梢血幹細胞に次ぐ第3の造血幹細胞供給源として期待されている。しかし、臍帯血の第一の問題点は含有造血幹細胞数が限られており、体重の重い患者への適用は困難であることである。細胞数が $1.5 \times 10^7/\text{kg}$ 以下の場合には移植細胞の生着および患者の生存に関して重篤な障害が起こる。そのため患者体重kgあたり 2×10^7 個が必要で、確実な生着のためには $3.7 \times 10^7/\text{kg}$ が望ましいとされている²⁾。第二の問題点は、たとえ移植細胞数が充分でも造血細胞の生着特に血小板および免疫系の回復が遅延することである³⁾。臍帯血移植がより広く有効に行われるためにはこのような問題点が克服される必要がある。近年、国内外で臍帯血幹細胞を各種サイトカインの組み合わせによりex vivoで増幅する

さまざまな試みが展開されている。

Annual Review 2000において1999年までの臍帯血幹細胞体外増幅のreviewを行ったので、ここではその後3年間のこの領域の進展について概説する。1999年7月に米国NIHが臍帯血幹細胞体外増幅の問題点に関するワークショップを開催した。そこで討論された解決すべき問題点を改変して表1にまとめた⁴⁾。その一部はこの3年間で

表1 体外増幅臍帯血幹細胞移植の問題点
(1999 NIH workshopより一部改変)⁴⁾

1. ヒト造血幹細胞はどのようなアッセイ系で測定されるのか？
2. 体外増幅操作により幹細胞の生着・ホーミング能力は修飾されるか？
3. 幹細胞あるいは増幅支持細胞に特有の遺伝子発現プロファイルはどのようなものか？
4. 自己複製因子は存在するか？自己複製に関与する遺伝子は何か？
5. どの細胞群を増幅するか？幹細胞か、前駆細胞か、アクセサリ細胞か？
6. 体外増幅の培養条件は？どのサイトカインを用いるか？支持細胞は必要か？
7. 増幅幹細胞により再構築された造血・免疫系の機能をどのように検討するか？
8. 臨床応用のための規制はどのようにすべきか？

解決されつつある。すなわち、定量的SRC (SCID-repopulating cells) アッセイが普及し、それぞれの方法による増幅効率がSRCの増幅効率として評価された。さらに長期間にわたる造血維持能はヒツジ胎仔への異種移植により検討された。この結果、従来の体外増幅法の問題点が明らかとなってきた。既存の造血系サイトカインの組み合わせでは増幅効率に限界があるため新たな造血幹細胞自己複製因子が探索されている。たとえば初期発生過程で器官・形態形成や中胚葉誘導に重要な働きを有する bone morphogenetic protein (BMP), hedgehog, Notch legand Wntなどの因子が造血幹細胞の自己複製や生存にも重要であることが明らかにされた。一方、移植細胞数不足を克服するもうひとつの方法として二つ以上の臍帯血を同時に同一患者に移植する方法が最近注目されている。複数臍帯血移植の臨床試験も開始されているので最後に若干紹介する。

A. 臍帯血幹細胞の体外増幅

臍帯血幹細胞の体外増幅が臨床応用されるためには、前臨床段階でその有効性、安全性、経済効率、利便性などが検討されなければならない。有効性の評価で最も重要なのはヒト幹細胞をどのように測定するかである。ヒト造血幹細胞の定量は現在、免疫不全マウスにヒト細胞を移植する異種移植によってのみ可能である。すなわちNOD/SCID (nonobese diabetic/scid) マウスに長期生着可能で造血再構築能のあるヒト細胞をSCID-repopulating cells (SRC) と名付け、定量的SRCアッセイをヒト造血幹細胞の代替測定法としている。この測定法により体外増幅が可能な方法としてサイトカインを組み合わせた方法とそれに加えて支持細胞を利用した方法が報告されている。

1. ヒトサイトカインの組み合わせによる体外増幅系

さまざまなサイトカインの組み合わせが比較されたが、TPO, FLを含む組み合わせで初めてヒト造血幹細胞の増幅が可能であることが示された。すなわち、Eaves, Dick, Nakahataらはこれらのサイトカインを含む無血清培養系で4日から8日の培養期間で2~4倍のSRC増幅に成功している⁵⁻⁷⁾。但し、実際の臨床応用に際しては凍結細胞を解凍したり、CD34陽性細胞を純化するなどの細胞プロセッシングの過程で50%以上の細胞の損失があるので、それを補うだけの増幅効率が必要とされる。保存臍帯血をそのまま移植した場合と比較してどの程度の増幅効率が必要になるのか今後の検討が必要である。

PiacibelloらはTPO, FLを基本としたサイトカインの組み合わせを用いて長期間培養することにより、9週間で約70倍のSRCの増幅に成功している^{8,9)}。しかし臨床応用するための安全性、利便性を考えると、培養期間は7日以内が望ましいと考えられる。

マウスを用いた異種移植では3~6カ月程度しか造血維持能をみることができないのが欠点である。長期にわたる造血維持能をみるためにヒツジ胎仔を宿主とした異種移植が利用されている。McNieceらはSCF, TPO, G-CSFを用いた無血清培養系で、7日、14日間培養した臍帯血CD34細胞をヒツジ胎仔に移植した結果を報告している¹⁰⁾。14日間培養した細胞を移植したヒツジでは、培養しないもの、7日間培養したものに比較して速やかな生着を認めた(3週後のキメリズムは9.2 vs 3.1 vs 0.1%)。しかしながらその後、ヒト細胞は時間経過とともに減少し16カ月後には14日間培養した細胞を移植したヒツジではヒト細胞は消失していたのに対し、培養しないもの、7日間培養したものでは生着が維持されていた。2次移植、3次移植実験においても14日間培養し

た細胞は生着しなかったが培養しないもの、7日間培養したものでは生着を認めた。さらに2次移植、3次移植においては7日間培養したものでは時間経過に従ってヒト細胞の存在比率が減少したが、培養していないものでは生着が維持されていた。このようにヒツジ胎仔への移植系によりSRCアッセイでは観察することができない長期造血を観察することができる。以上の結果からSCF, TPO, G-CSFを用いた無血清培養系においては体外増幅された細胞は生着を促進する効果があるが、長期造血を維持する能力は失われることが示された。従って臨床プロトコールにおいては増幅した細胞と増幅操作を加えない細胞の両フラクションを移植に用いる必要があると考えられた。

以上のように現状のサイトカインの組み合わせでは体外増幅を行う上で限界のあることが示されている。

2. 支持細胞を利用した体外増幅系

骨髓ストローマ細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞などの支持細胞との共培養により、サイトカインのみで培養するより効率のよい増幅が得られることが報告されている。

Kawada マウス骨髓ストローマ細胞株 HESS-5 を利用した膜分離型共培養系を考案し、無血清培地でTPO, FL, SCFの存在下に5日間でCD34⁺細胞で15倍、LTC-ICで25倍の増幅に成功している¹¹⁾。さらにこれらの細胞は定量的SRC assayでも10倍以上の増幅が可能であることが確認されている。

一方Verfaillieらのグループは以前よりストローマ細胞由来の液性因子が造血幹細胞の増幅に有効であることを報告しているが¹²⁾、定量的SRCアッセイを用いてこれらの効果を評価した¹³⁾。マウス胎仔肝ストローマ細胞であるAFT024の培養上清とサイトカインFL, SCF, IL-7 (FS7-

SNC)あるいはFL, TPO (FT-SNC)を組み合わせた培養条件で7日あるいは14日の体外培養を行った細胞を用いてSRCアッセイを行った。培養前のCD34細胞のSRC頻度は $3.8/10^5$ であるのに対し、FS7-SNCの7日培養では $6.5/10^5$ と1.7倍の増幅を示したが、14日培養では $3.6/10^5$ であった。FT-SNCの条件では7日培養では $3.2/10^5$ とSRC頻度は不変であったが、14日培養では $7.2/10^5$ と1.9倍の増幅を認めた。同グループは以前ストローマ細胞の培養上清中の幹細胞増幅因子としてN-desulfated-O-sulfated heparin, MIP-1a, MCP-1, VEGF, IL-8などが重要であることを示しているが^{14,15)}、これらにTPO, FL, SCF, IL-7を加えたMV8培地を用いて培養すると、7日間培養ではSRC頻度は $1.4/10^5$ と低下するが、14日間培養では $6.1/10^5$ と1.6倍の増加を示した。さらに長期の造血維持能をヒツジ胎仔への異種移植により確認した。培養前のCD34細胞およびFS7-SNCの7日培養および14日培養をヒツジ胎仔に移植した。培養前およびFS7-SNC7日培養の細胞は3次移植まで造血を維持することが可能であり、長期造血維持能をもつことが示された。一方、14日培養したものは2次移植までしか造血維持能を示さず培養により長期造血を維持する細胞が失われた。これらの結果はストローマ細胞の効果の一部は液性因子で置換することが可能であることを示している。これらの液性因子や後に紹介する中胚葉因子などストローマ細胞由来の機能分子を追求していくことは今後の重要課題である。

ブタの微小血管内皮細胞を造血支持細胞として利用してヒト造血幹細胞を増幅する試みが報告された。ヒト骨髓CD34⁺Thy-1⁺Lin⁻細胞をブタ微小血管内皮細胞上で2週間IL-3, IL-6, GM-CSF, SCF存在下に培養するとSCID-huマウスに長期生着可能なヒト造血幹細胞を増幅することが可能であった。ストローマなしの条件ではヒト細胞の存在は確認されなかった¹⁶⁾。さらに同グループ

はヒビを使った前臨床試験を行っており、10日間の培養で4~5倍のCD34⁺細胞の増幅を得、宿主への生着を認めた。以上より本システムの有用性と安全性が確認されたとしている¹⁷⁾。

ヒト間葉系幹細胞 (MSC) との共培養により臍帯血細胞を増幅する試みが2001年のアメリカ血液学会で報告された¹⁸⁾。CD34細胞純化することなく臍帯単核細胞をSCF, TPO, G-CSFを用いた無血清培養系でMSCと共培養した。その結果全有核細胞数で4~7倍、前駆細胞で100倍以上の増幅が得られた。今後ヒトMSCが臍帯血幹細胞の増幅支持細胞として有用であることが確認されれば、安全性の面から最も有用な支持細胞となるであろう。

3. 臍帯血幹細胞増幅の臨床応用

臨床応用はアメリカ血液学会でいくつかの施設で施行されていることが報告されているが、2002年7月現在論文としては発表されていない。コロラド大学のグループは37例 (成人25例, 小児12例) の血液悪性腫瘍, 乳癌の患者を対象に一部を体外増幅した臍帯血を投与している¹⁹⁾。Isolex300で純化したCD34⁺細胞をテフロンバッグ中で、SCF, G-CSF, thrombopoietin (TPO) 存在下に10日間培養した。111倍の細胞増幅がみられ、CD34⁺細胞は4.5倍増幅していた。評価可能な33例のうち31例で好中球生着 (平均26日) と血小板生着 (平均59日) を認めている。50%に急性GVHD (grade1~2; n=8, grade3~4; n=8), 100日以上経過を経ている15例の67%に慢性GVHDを認めた。生着不全は6%に認められ、増幅していない臍帯血移植で報告されている15~60%に比較すると少ないと考えられた。成人例では増幅しない臍帯血移植を受けている小児と同等の生着を示していた。

今後、臨床試験においても増幅細胞の長期造血維持能は慎重に追跡されなければならないが、こ

れらは遺伝子マーキングあるいは一方のみを増幅した複数臍帯血を用いた移植により可能となるであろう。

B. 中胚葉誘導・形態形成因子の幹細胞増幅活性

前駆細胞の増幅は良好に得られるのに対して幹細胞に相当するSRCでは2~4倍の増幅しか得られないことから、既存の造血サイトカインのみによる幹細胞増幅の限界が認識されつつある。一方、初期発生過程で器官形成、形態形成や中胚葉誘導に重要な働きを有するbone morphogenetic protein (BMP), hedgehog, Notch ligand Wntなどの因子が幹細胞の自己複製や生存に重要であるとの報告が注目されている²⁰⁾。カエルでは中胚葉誘導因子が直接造血組織を誘導することが示されている²¹⁾。骨髄ストローマ細胞がこれらの因子を産生して造血幹細胞の維持、増幅を支持する可能性について興味を持たれる。

1. bone morphogenetic protein (BMP)

bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) はカエル *Xenopus* の腹側中胚葉に発現し、造血細胞へのコミットメントを誘導する。ヒト造血幹細胞を含むLin⁻CD34⁺CD38⁻細胞はBMP type I receptors activin-like kinase (ALK)-3とALK-6およびその下流のシグナルトランスデューサーであるSMAD-1, 4, 5を発現していることからBMPのシグナル伝達系を細胞内に有することが示された。そこでBhatia Mらは臍帯血Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞に対するBMPの作用をSRCアッセイにより検討した²²⁾。高濃度のBMP-2および7はSRCの増殖を抑制したが、再構築能を維持した。一方低濃度のBMP-4はLin⁻CD34⁺CD38⁻細胞の増殖と分化を誘導したが、高濃度のBMP-4は再構築能の維持される体外培養期間

を延長した。従ってBMP-4は幹細胞の生存に対して効果があると推察された。造血サイトカインの多くが幹細胞の分化を促進するのに対して中胚葉系因子は幹細胞の未分化性を維持すると考えられた。

2. hedgehog

hedgehogはもともと1980年に報告されたショウジョウバエの変異体の名前で、腹側の体節後部の表皮に剛毛をもちハリネズミ (hedgehog) のようになる変異の原因遺伝子である。脊椎動物のhedgehog (Hh) は4種類存在することが知られており、Shh (sonic hedgehog), Dhh (desert hedgehog), Ihh (indian hedgehog), twhh (tiggy-winkle hedgehog) とそれぞれ名付けられている。N末端にシグナルペプチドをもつ分泌性タンパクである。hhファミリーの特徴は自己消化を行うプロテアーゼ活性をもつことである。形態形成、左右軸の決定などに関与していることが示されている。さらにBMP-4の上流の中胚葉誘導因子としても機能している。BMP-4が上記のように造血幹細胞に作用していることがわかったので、Hhについても同様の検討がなされた²³⁾。造血幹細胞のサイトカインによる増殖はHhの中和抗体により抑制され、逆にSHh投与によりSRCが増幅したことからSHhが造血幹細胞の増幅作用があることが示された。BMP-4の特異的抑制因子として働くnogginはSHhによる幹細胞増幅を抑制したことより、SHhはBMP-4を介して幹細胞の増幅をコントロールしていることが示唆された。SHhは造血幹細胞自身でも産生されるが、骨髄ストローマ細胞からも産生されオートクラインおよびパラクラインにより造血幹細胞に作用することが予想される。

3. Notch

Notchもショウジョウバエの変異体よりみいだ

された遺伝子で、未分化な腹側外胚葉 (神経外胚葉) の発生運命を制御する細胞間相互作用にかかわる受容体である。ニューロプラストと表皮細胞の分化選択を制御している。その後、Notchは広く多様な細胞の分化能、分化状態を制御する機能があることが明らかとなってきた。血液細胞に関しても、CD4/CD8細胞²⁴⁾ やTCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$ 細胞²⁵⁾ などのT細胞の分化や骨髄系細胞の分化制御²⁶⁾ にも関与することが報告された。骨髄ストローマ細胞はNotchのリガンドであるJagged-1, Delta-1, Delta-4を発現し、造血幹細胞はNotch-1, 2を発現している。可溶性Jagged-1を幹細胞の培養系に加えると増殖に対しては中等度の影響しかなかったが、SRC活性を測定すると幹細胞の生存と増幅を誘導することが明らかとなった²⁷⁾。可溶性Delta-1, Delta-4は試験管内で造血前駆細胞の増殖をうながした。さらに可溶性Delta-1はSRC活性も増幅することが示された²⁸⁾。以上の結果より骨髄微小環境の中でNotch-Notch ligand系も造血幹細胞の増幅に関与しているものと考えられている。

以上のように初期発生に関与する中胚葉誘導因子、器官形成因子が成体においても造血幹細胞の増殖、生存に関与する可能性が示唆されてきたが、骨髄ストローマ細胞の造血幹細胞支持能がこれらの分子のみに還元できるのか否かは今後の研究課題である。骨髄ストローマ細胞の役割を解明していく上で興味深い分子群である。

また最近、転写因子であるHOXB4を過剰発現させることにより造血幹細胞が増幅可能であることが報告された^{29,30)}。自己複製因子を同定するためには上記のようにSRCアッセイなどの造血幹細胞アッセイが行われ時間と労力を要しているが、今後はたとえばHOXB4などの発現誘導を指標としてより簡便な自己複製因子スクリーニング法の開発が期待される。

C. 増幅幹細胞の分化能

臍帯血中の免疫担当細胞は未熟であり、一般的に臍帯血の免疫応答は成人血に比較して低いとされている^{31,32)}。このような低免疫応答性は臍帯血移植においてGVHDの程度が軽く、HLA一致度が4/6まで移植可能という利点をもたらす一方で移植後の重篤なウイルス感染、GVL効果の低下が懸念されている。また一般に造血幹細胞移植後の免疫系再構築は緩やかであるが、特に純化したCD34⁺細胞を用いた移植においてはT細胞系の回復が著しく遅れることが明らかとなっている³³⁾。従って体外増幅幹細胞の移植を想定した場合、増幅幹細胞から免疫担当細胞への分化能の検討は重要な課題である。従来このような検討は増幅細胞を移植した異種動物中でヒト細胞の分化マーカーを解析しただけであり、機能的な検討はほとんど行われていなかった。本稿では増幅臍帯血幹細胞のB細胞、T細胞、樹状細胞(DC)への機能的分化能を検討した結果を紹介する。

1. 成熟Bリンパ球への分化

LiらはKawadaらの考案した体外増幅培養システム¹¹⁾により増幅された臍帯血CD34⁺細胞のB細胞への分化能を検討するために、増幅後細胞を移植したNOD/SCIDマウスを用いて以下の検討を行った³⁴⁾。ヒト造血細胞の生着を確認後、移植後6週目より2週間毎にDNP-Ficoll, DNP-OVA, DNP-KLHの3種類の抗原を腹腔内投与した。14週後の骨髄、脾臓、末梢血の解析ではCD19⁺細胞の中でCD10⁺の未熟B細胞は骨髄で $87.1 \pm 1.1\%$ 、脾臓で $14.3 \pm 2.2\%$ 、末梢血で $38.6 \pm 3.8\%$ 、一方sIgM⁺の成熟B細胞は骨髄で $28.4 \pm 9.1\%$ 、脾臓で $88.8 \pm 3.4\%$ 、末梢血で $76.4 \pm 1.2\%$ という分布を示した。これは臓器特異的なB細胞分化を反映するものと解釈された。抗DNP抗体をELISAにより測定すると、対照群で

は抗DNP抗体を検出しなかったが、DNP-Ficoll投与群で3/5, DNP-OVA投与群で3/4, DNP-KLH投与群で4/4で抗DNP抗体を検出した。さらにDNP-KLH投与群の2匹のマウスで抗DNP抗体のクラスを測定したところIgMが主要な抗体クラスであったが、微量のIgGも検出された。以上の結果より増幅された臍帯血CD34⁺細胞より分化したB細胞はマウス体内で胸腺非依存性抗原(DNP-Ficoll)に反応して特異的抗体を産生するだけでなく、胸腺依存性抗原(DNP-OVA, DNP-KLH)にも反応して特異的抗体(IgM, IgG)を産生しうることが示された。

2. 成熟Tリンパ球への分化

ヒト造血幹細胞からT細胞への分化は従来、ヒト胎児胸腺と造血幹細胞を免疫不全マウスに移植したSCID-Huマウスあるいはマウス胎児胸腺を用いた胎児胸腺器官培養(FTOC)により解析されてきた。しかしながら前者はヒト胎児組織を利用することが困難であること、後者は成熟T細胞まで分化させることが困難である等の問題点があった。

RobinらはNOD/SCIDマウスの胸腺を用いたFTOCによりヒト臍帯血CD34細胞より未分化マーカーであるCD1a陰性のCD4単独陽性成熟Tリンパ球が分化可能であることを報告した³⁵⁾。Saitoらはマウス胸腺上皮とヒト臍帯血CD34細胞の再凝集胸腺器官培養(RTOC)をさらにNOD/SCIDマウスの腎皮膜下に移植することによりCD34細胞をCD4およびCD8単独陽性の成熟Tリンパ球まで分化させることが可能であることを示した³⁶⁾。さらにこの系を用いてKawadaらの考案した体外増幅培養システム¹¹⁾により増幅された臍帯血CD34⁺細胞がIL-2, IL-4などのサイトカイン産生能をもつ機能的T細胞へ分化することを示した。

Yahataらは(財)実験動物中央研究所の伊藤

らが開発したNOD/Shi-scid, IL-2R γ 欠損 (NOG) マウスを利用することにより臍帯血CD34⁺細胞が成熟T細胞まで分化することを確認した³⁷⁾。すなわち臍帯血CD34⁺細胞を移植したNOGマウスでは移植後12週頃より末梢血中にヒトCD3⁺細胞が出現し、これらの細胞はCD4⁺細胞50%、CD8⁺細胞47%であり、TCR $\alpha\beta$ 陽性であった。胸腺ではCD4⁺CD8⁺細胞、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、脾臓ではCD4⁺細胞、CD8⁺細胞を検出した。TCRV β のクロナリティーは健康成人末梢血のT細胞と同様なポリクローナルなパターンを示した。さらに脾臓のT細胞はPHA, IL-2および同種抗原に反応したが、マウス細胞および自己非T細胞には反応を示さなかった。この結果はNOGマウスに移植されたヒトCD34⁺細胞がマウス胸腺内でCD4⁺細胞あるいはCD8⁺細胞に分化し、これらの細胞はポジティブおよびネガティブ選択を受けた成熟T細胞として末梢リンパ組織に分布していることを示している。この系を利用することによっても体外増幅された臍帯血CD34⁺細胞がアロ特異的T細胞まで分化可能であることが示される。

3. 成熟樹状細胞への分化

樹状細胞は最も強力な抗原提示細胞であり、近年さまざまな免疫療法への利用が試みられている。体外増幅培養後のCD34⁺細胞はGM-CSF, IL-4, TNF- α 存在下に培養することによりデキストラン貪食能およびアロ抗原反応性CTLを誘導可能な樹状細胞に分化する³⁸⁾。単一の臍帯血CD34陽性細胞より上記樹状細胞誘導培養により28日後には166個のCD83あるいはCD1a陽性細胞が得られるのに対し、5日間の体外増幅培養後に樹状細胞を誘導することにより1個の臍帯血CD34陽性細胞より3200個の同様の細胞が得られる計算となり、樹状細胞を多量に得て免疫療法を行う上でも幹細胞体外増幅系は有用であった。

臍帯血移植後にはその免疫能の未熟性からEBウイルス, サイトメガロウイルスなどの感染症, 原病の再発などが懸念されている。ウイルス特異的抗原遺伝子や腫瘍特異的抗原遺伝子を導入した樹状細胞は免疫療法に有用であると期待される。Okiらはレンチウイルスベクターで遺伝子導入されたヒト臍帯血CD34⁺細胞をKawadaらの体外増幅培養系¹¹⁾で4日間培養することにより9倍の増幅が可能でありSRC活性を保持することを確認した³⁹⁾。さらにこれらの細胞はGM-CSF, IL-4, TNF- α 存在下に培養することにより樹状細胞に分化させることが可能であり、10~14日後には遺伝子導入CD34⁺細胞数と比較して190倍の遺伝子導入樹状細胞が得られた。レトロウイルスベクターを用いた場合には分化後遺伝子発現が消失したのに対し、レンチウイルスベクターを用いた場合には良好な発現が認められた。これらの細胞は機能的にもCTLを誘導することができる成熟樹状細胞であった。単球由来樹状細胞はレンチウイルスベクターで遺伝子導入するとviabilityが低下すること、また増幅効率が低いことが知られている。従って遺伝子導入幹細胞の体外増幅は効率のよい遺伝子治療に利用可能であると同時に、免疫遺伝子治療にも応用可能であると考えられた。

D. 複数臍帯血の移植

移植細胞数不足を克服するもうひとつの方法は二つ以上の臍帯血を同時に同一患者に移植することである。ミネソタ大学では以下の条件の対象群に2ユニットの臍帯血を利用する臨床I相試験を行った⁴⁰⁾。1) 血縁者ドナーのいないハイリスクあるいは進行した血液腫瘍, 2) HLA完全マッチの非血縁ドナーが存在しないか, 緊急の移植が必要な場合, 3) $3.5 \times 10^7/\text{kg}$ 以上の4/6以上のマッチ臍帯血が存在しない場合。8例の患者がこの条

表2 複数臍帯血移植後の造血キメリズム⁴⁰⁾

患者番号	移植細胞数 全 (UCB # 1 + UCB # 2) × 10 ⁷ /kg	HLA 一致 UCB # 1/# 2 対宿主 (対移植片)	好中球 ≥ 500 到達日	移植 21 日のドナーキメリズム
	Total (UCB # 1 + UCB # 2)			UCB # 1/UCB # 2/Recipient
1*	2.3 (1.2 + 1.1)	4/4 (5)	+ 25	76%/21%/3%
2	2.8 (1.4 + 1.4)	4/4 (4)	+ 26	100%/0%/0%
3	3.3 (1.0 + 2.3)	5/5 (4)	+ 21	0%/100%/0%
4*	6.2 (3.5 + 2.7)	4/4 (4)	+ 23	100%/0%/0%
5	3.9 (2.4 + 1.5)	5/5 (4)	+ 28	100%/0%/0%
6	3.3 (1.5 + 1.8)	5/5 (4)	+ 24	33%/65%/2%
7	2.9 (1.6 + 1.3)	4/5 (4)	+ 28	0%/100%/0%

症例1と4は骨髄破壊的前処置, 他は非破壊的前処置を受けた。

件に合致し移植を施行した。7例が解析可能であった (表2)。8例中4例が生存中であり, 2例は感染, 2例は元病の再発で死亡した。全例で生着が認められたが, 5例で一方のドナー造血が100%となった。以上の結果は, 複数の同種臍帯血を同時に移植することは生着不全を引き起こす危険なく安全に施行可能であることを示しており, 今後多数例による臨床試験を進めることが必要であると考えられた。

むすび

造血幹細胞の体外増幅が可能となれば臍帯血移植の成人への利用が可能となるだけでなく, 他の造血ソースでも少量の骨髄液や末梢血中のごく少数の造血幹細胞を増幅することにより, ドナー・患者に負担の少ない造血幹細胞移植が可能となる。また, 輸血用血液製剤は現在献血制度により支えられているが, 近い将来日本においては高齢化に伴う輸血需要人口の増大と輸血供給人口の減少による血液製剤の不足が懸念されている。造血幹細胞増幅と分化制御が可能になれば試験管内で赤血球や血小板をはじめとする血液製剤を供給することも夢ではなくなるであろう。

文献

- 1) Kato S, Nishihira H, Sako M, et al. Cord blood transplantation from sibling donors in Japan report of the national survey. *Int J Hematol* 1998; 67: 389-96.
- 2) Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chamard A, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *N Eng J Med* 1997; 337: 373-81.
- 3) Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996; 335: 157-66.
- 4) Verfaillie CM. Meeting report on an NHLBI workshop on ex vivo expansion of stem cells. July 29, 1999, Washington, D. C. *Exp Hematol* 2000; 28: 361-4.
- 5) Bhatia M, Bonnet D, Kapp U, et al. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* 1997; 186: 619-24.
- 6) Conneally E, Cashman J, Petzer A, et al. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9836-40.
- 7) Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 2000; 105: 1013-21.

- 8) Piacibello W, Sanavio F, Severino A, et al. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34⁺ cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 1999; 93: 3736-49.
- 9) Piacibello W, Sanavio F, Garetto I, et al. Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self-renewal and amplification vs proliferation and differentiation. *Leukemia* 1998; 12: 718-27.
- 10) McNiece IK, Almeida-Porada G, Shapall EJ, et al. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. *Exp Hematol* 2002; 30: 612-6.
- 11) Kawada H, Ando K, Tsuji T, et al. Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. *Exp Hematol* 1999; 27: 904-15.
- 12) Punzel M, Gupta P, Roodell A, Mortari F, Verfaillie C. Factors secreted by AFT024 fetal liver cells following stimulation with human cytokines are important for human LTC-IC growth. *Leukemia* 1999; 13: 1079-84.
- 13) Lewis ID, Almeida-Porada G, Du J, et al. Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system. *Blood* 2001; 97: 3441-9.
- 14) Gupta P, Oegema T, Brazil J, Dudek A, Slungaard A, Verfaillie C. Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. *Blood* 1998; 92: 4641-51.
- 15) Gupta P, Oegema T, Brazil J, Dudek A, Slungaard A, Verfaillie C. Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks in vitro when interleukin-3 and a single chemokine are combined with O-sulfated heparan sulfates: requirement for optimal binding interactions of heparan sulfate with early-acting cytokines and matrix proteins. *Blood* 2000; 95: 147-55.
- 16) Brandt JE, Galy AH, Luens KM, et al. Bone marrow repopulation by human marrow stem cells after long-term expansion culture on a porcine endothelial cell line. *Exp Hematol* 1998; 26: 950-61.
- 17) Brandt JE, Bartholomew AM, Fortman JD, et al. Ex vivo expansion of autologous bone marrow CD34⁺ cells with porcine microvascular endothelial cells results in a graft capable of rescuing lethally irradiated baboons. *Blood* 1999; 94: 106-13.
- 18) McNiece IK, Harrington JA, James RI, et al. Ex vivo expansion of CB cells without CD34 selection using coculture on MSC. *Blood* 2001; 98: 851a.
- 19) Shpall EJ, Quinones R, Giller R, et al. Transplantation of adult and pediatric cancer patients with cord blood progenitors expanded ex vivo. *Blood* 2000; 96: 207a.
- 20) Zon LI. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 1995; 86: 2876-91.
- 21) Dosch R, Gawantka V, Delius H, et al. Bmp-4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*. *Development* 1997; 124: 2325-34.
- 22) Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1139-47.
- 23) Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Kananu N, Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nature Immunology* 2001; 2: 172-9.
- 24) Robey E, Chang D, Itano A, et al. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 1996; 87: 483-92.
- 25) Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, et al. Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* 1997; 88: 833-43.
- 26) Milner LA et al. Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13014-9.
- 27) Kananu FN, Murdoch B, Gallacher L, et al. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1365-72.
- 28) Kananu FN, Murdoch B, Miyabayashi T, et al. Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* 2001; 97: 1960-7.
- 29) Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 2002; 109: 39-45.

- 30) Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* 2002; 100: 862-8.
- 31) Griffiths-Chu BS, Patterson JA, Berger CL, et al. Characterization of immature T cell subpopulations in neonate blood. *Blood* 1984; 64: 296-300.
- 32) Hagihara M, Chargui J, Gansuud B, et al. Umbilical cord blood T lymphocytes are induced to apoptosis after being allo-primed in vitro. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 1229-33.
- 33) Negrin RS, Atkinson K, Leemhuis T, et al. Transplantation of highly purified CD34⁺ Thy-1⁺ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6: 262-71.
- 34) Li C, Ando K, Kametani Y, et al. Production of antigen specific human immunoglobulin in NOD/SCID mice reconstituted by cord blood CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 1036-43.
- 35) Robin CA, Bennaceur-Griscelli F, Louache W, Vainchenker, Coulombel L. Identification of human T-lymphoid progenitor cells in CD34⁺ CD38 low and CD34⁺ CD38⁺ subsets of human cord blood and bone marrow cells using NOD-SCID fetal thymus organ cultures. *Br J Haematol* 1999; 104: 809.
- 36) Saito Y, Kametani Y, Hozumi K, et al. The in vivo development of human T cells from CD34⁺ cells in the murine thymic environment. *Int Immunol* 2002; 14: 1113-24.
- 37) Yahata T, Ando K, Nakamura Y, et al. Functional human T lymphocytes development from cord blood CD34⁺ cells in NOD/Shi-scid, IL-2R γ null mice. *J Immunology* 2002; 169: 204-9.
- 38) Hagihara M, Li C, Gansuud B, et al. Extensive and long-term ex vivo production of dendritic cells from CD34⁺ umbilical cord blood or bone marrow cells by novel culture system using mouse stroma. *J Immunol Methods* 2001; 253: 45-55.
- 39) Oki M, Ando K, Miyatake H, et al. Efficient lentiviral transduction into human cord blood CD34⁺ cells and differentiation into dendritic cells. *Exp Hematol* 2001; 29: 1210-7.
- 40) Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. Impact of multiple unit unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adults: Preliminary analysis of safety and efficacy. *Blood* 2001; 98: 666a.

10 レジストリー

1 はじめに

内科的治療に反応しない急性重症心不全に対する機械的補助循環法として、本邦においては簡便に施行できるPCPSが広く用いられるようになってきた。PCPS(経皮的な心肺補助法)研究会[事務局:大阪大学臓器制御外科(第一外科)]が本邦におけるPCPSの現状についてのアンケート調査を行った。今回2000~2002年における結果を報告する。

2 アンケート調査方法

PCPSの定義を明らかにし、全国の主要医療機関の循環器内科、心臓血管外科、救急部、集中治療部、麻酔科のうち、これまでにPCPSの使用経験がある833施設へアンケート調査表を郵送した。

■ (1) 日本におけるPCPSの定義

原則的に大腿静脈などから中枢に挿入したカニューレから遠心ポンプにより脱血し、膜型人工肺で酸素化した血液を大腿動脈などより挿入したカニューレより全身に灌流する閉鎖回路(リザーバを有さない)による補助循環である。

■ (2) 使用目的

- 1) 急性心肺不全に対するPCPS
- 2) 開心術後症例のPCPS
- 3) PTCA時のPCPS
- 4) 肺や気管支手術時のPCPS
- 5) 救命救急領域に対するPCPS

■ (3) 調査期間

2000年1月1日から2002年12月31日

■ (4) アンケート内容

使用目的、使用した回路と抗凝固療法、合併症、成績、各使用目的別に疾患、補助期間、PCPSと併用したあるいは移行した補助手段などである。なお、死亡の定義としては、PCPS中あるいはPCPS離脱後1ヶ月以内に死亡した症例とした。

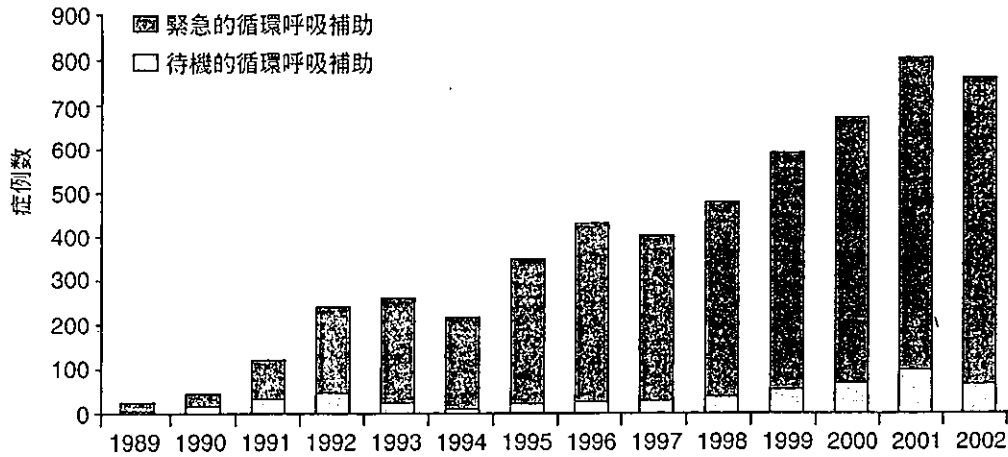


図1 PCPS 症例数年次推移

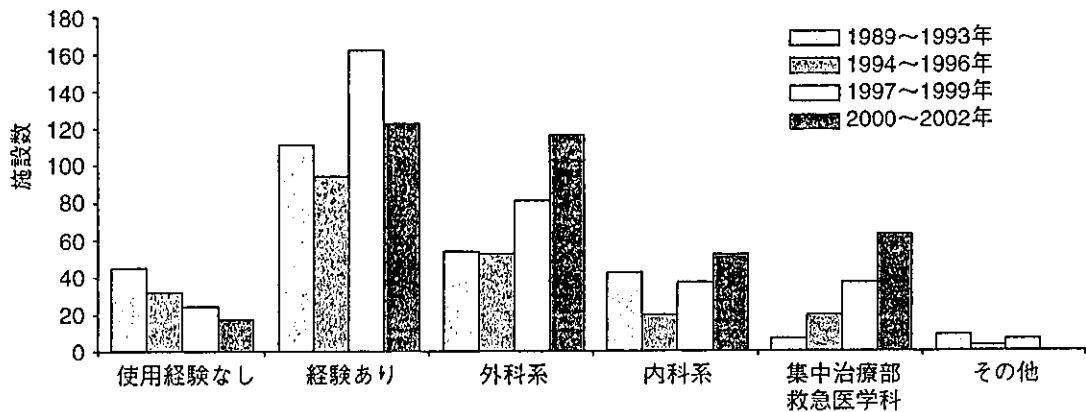


図2 PCPS 経験施設の分布

3

アンケート調査の結果と考察

アンケートの回答は148施設(18%)から得られた。

PCPS研究会によるアンケートが開始された1989～2002年の症例数の年次推移を図1に示すが、これまでに循環呼吸補助としてPCPSが5,414例に用いられている。また、症例数は年次的に増加しているが、待機的使用例は10%程度で、緊急例に多く用いられている。

PCPS経験施設の分布をみると、使用経験がない施設は12.7%である(図2)。使用経験がある施設においても、外科系、内科系に加え集中治療部・救急医学科での使用が増加している。

1997年から2002年までの使用例を目的別にみると、急性心肺不全が46%と最も多い(図3)。しかし、1997～1999年にはこの急性心肺不全が50%を占めていたが、2000～2002年には42～45%と比率が低下している。その他の使用目的を頻度順にみると、開心術後症例、救命救急領域、supported PTCA例、肺や気管支術症例となる。このなか

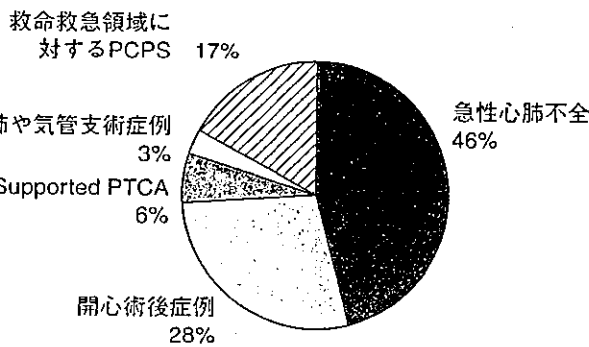
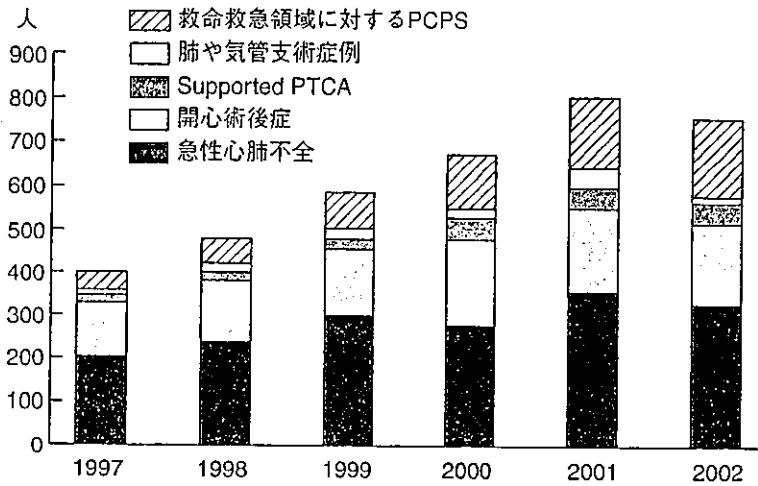


図3 使用目的

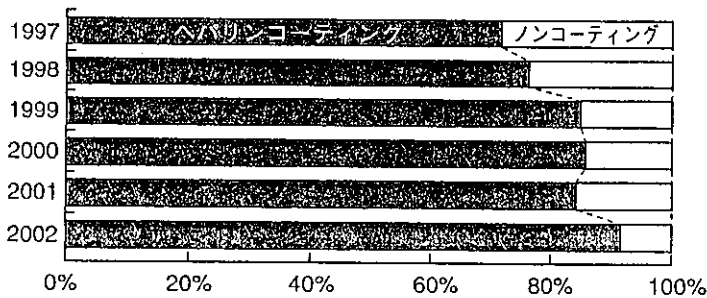


図4 ヘパリンコーティング回路の使用率の推移

で、救命救急領域は1997年の12%から増加し、2002年には23%を占め、倍増している。

ヘパリンコーティング回路の使用率の推移をみると、1997年71.9%であったのが、1999年には84.9%と増加し、さらに2002年には91.5%まで上昇している(図4)。また、抗凝固療法はヘパリンが広く用いられているが、併用剤として、低分子ヘパリン、アルガトロバン、メシル酸ナファモスタット、メシル酸ガベキサートなどがある(図5)。

使用症例の年齢分布をみると2000~2002年では、各年齢層で用いられている(図6)特に60~79歳が50%を占め、80歳以上でも6%に用いられており、高齢者への適応が

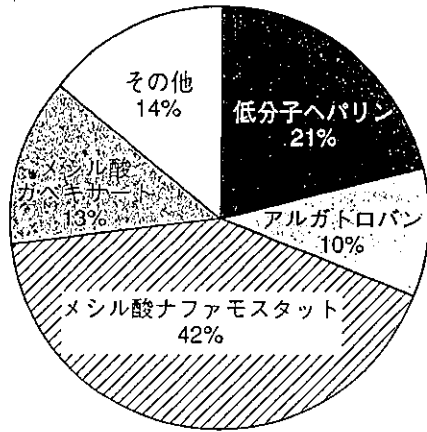


図5 併用剤した抗凝固療法

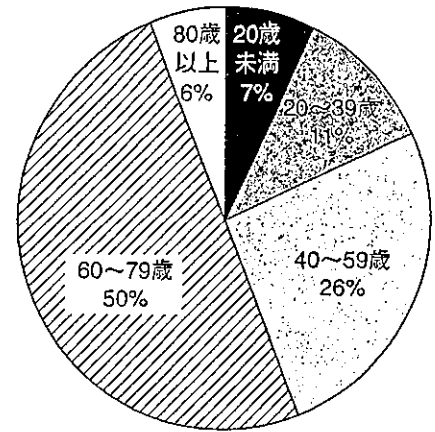


図6 使用症例の年齢分布

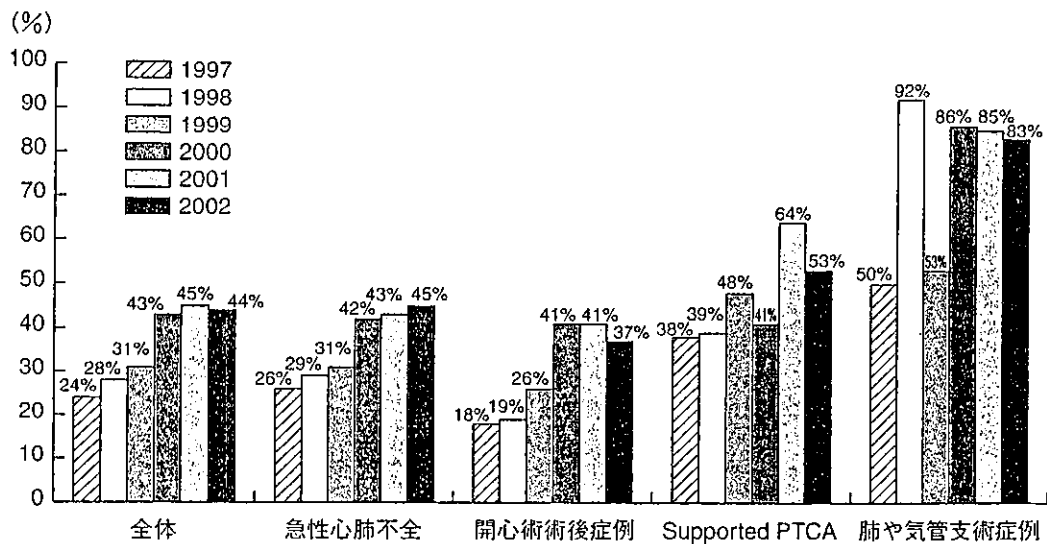


図7 使用目的およびそれぞれの生存率

多い。

次に、生存率を比較すると、全体では1997年の24%から1999年も31%まで向上してきたが、2000～2002年は43～45%と著明な向上がみられている。使用目的別に検討すると、急性心肺不全に対する成績は全体と同様に1997～1999年の26～31%から2000～2002年の42～45%と著明に向上している。開心術後症例においても、1997～1999年の18～26%から2000～2002年の37～41%と著明に向上している。これらの症例は全身循環不良例であるが、早期の適応などに加え、ヘパリンコーティング回路の積極的な使用も関与していると思われる。Supported PTCA例の成績は、2001年および2002年が上昇しているが、施行する症例における心機能や全身状態が関与していると考えられる。肺や気管支術症例に対しては、1997～1999年に比べ2000～2002年の成績が安定し良好な成績を示している（図7）。

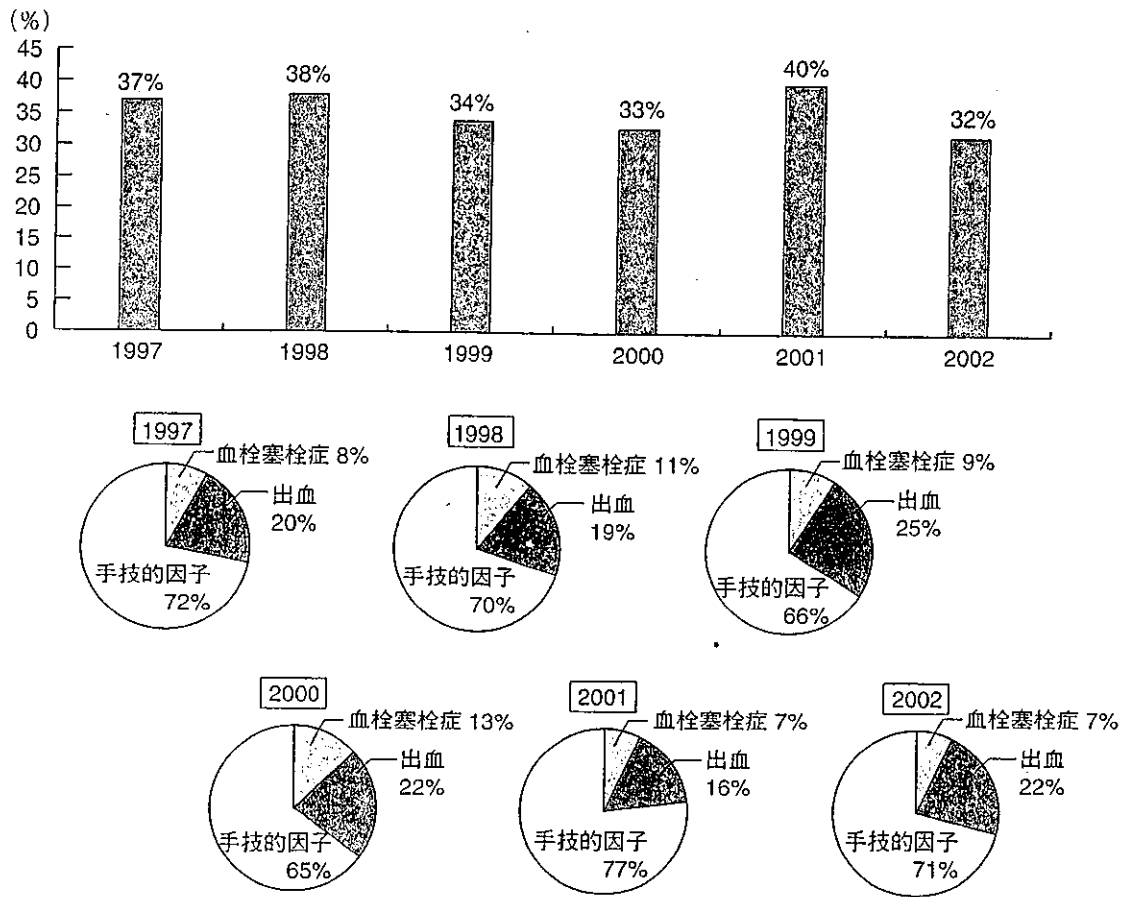


図8 合併症

PCPS施行時における合併症の頻度は32～40%と大きな変動はみられない。その内訳としては、刺入部や後腹膜出血、血管損傷、下肢祖血などの手技的因子が最も多く、65～77%を占めている。次いで脳、呼吸器、消化管での出血が多く16～25%を占め、脳、腹部臓器、四肢への血栓塞栓症が7～13%であった(図8)。これら手技的因子、出血、血栓塞栓症の頻度もこの6年間大きな変動はみられなかった。

PCPS開始後、他の補助手段に移行した症例は、急性心肺不全では38%で、その内訳はIABPが77%、通常的人工心肺が14%、補助人工心臓(VAS)が6%であった(図9)。開心術後症例では37%が他の補助手段へ移行し、大部分はIABP(89%)で、VASが6%、通常的人工心肺が2%であった。Supported PTCA例では補助循環を継続したものが多く、IABPが64%、PCPS続行が31%、VASが1%で、4%は手術を行っている。

死亡率は1997年75%、98年70%、99年71%と高率であったが、2000年は57%へ著明に減少し、2001年、2002年とも52%とさらに減少した。また、死因を検討すると、心由来が71%を占めており、この6年間大きな変化はなかった(図10)。心臓死以外では、多臓器不全(12%)、呼吸障害(7%)、出血(5%)、脳障害(3%)、感染症(2%)が原因であった。PCPS施行にもかかわらず心臓が主要な死因となっているのは、PCPS装着例における心機能障害が高度であり、PCPSでは循環補助は行えるものの左室への直接的な減負荷は得られず、さらに高流量補助時には左室への負荷を増大する可能性が

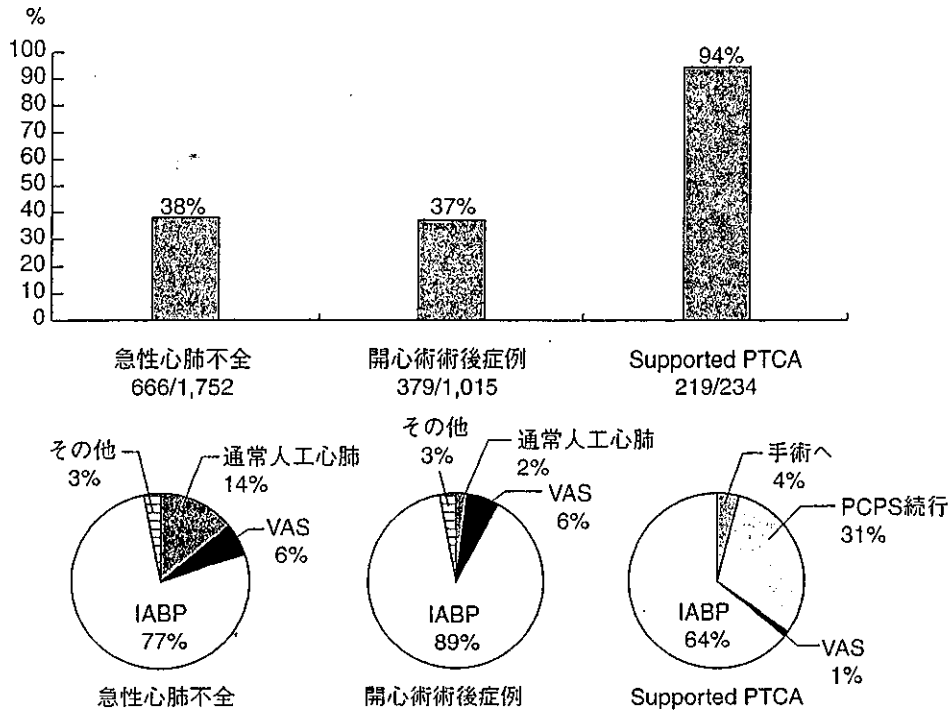


図9 PCPSより移行した他の補助手段

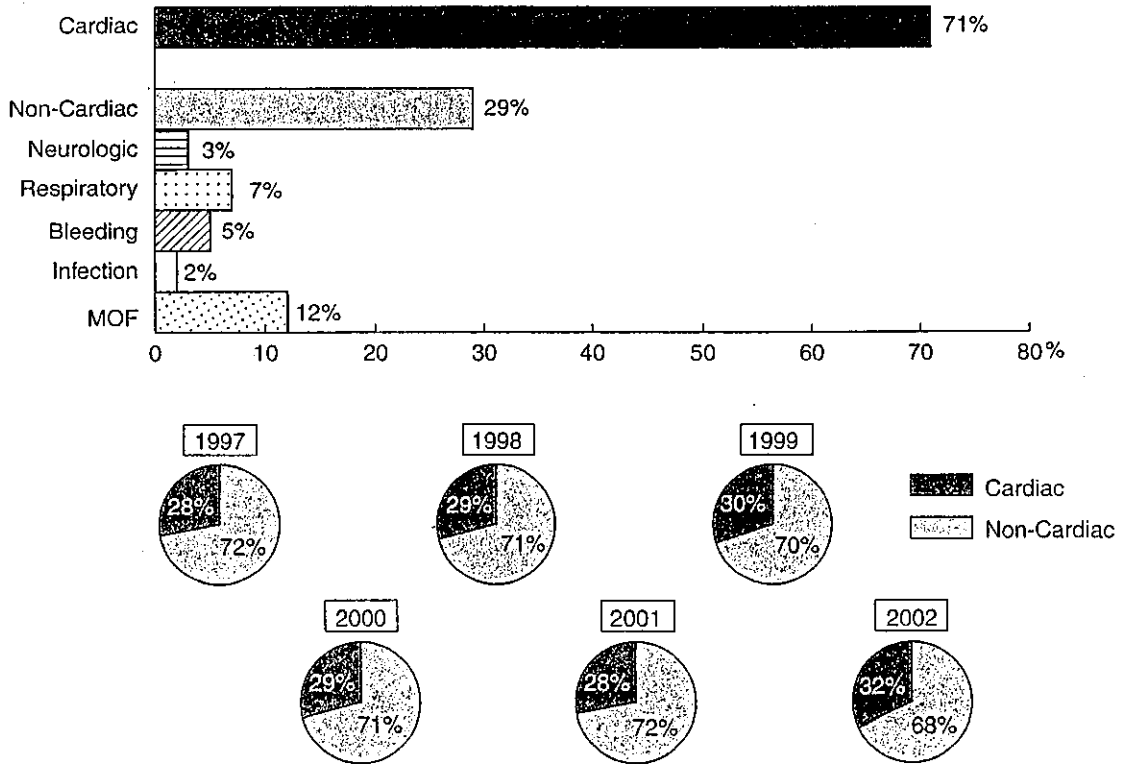


図10 死亡率および死亡要因

救命救命センターとしてPCPS開始基準を
作成していますか

院外心停止症例に対する心肺蘇生法としても
PCPSを施行していますか

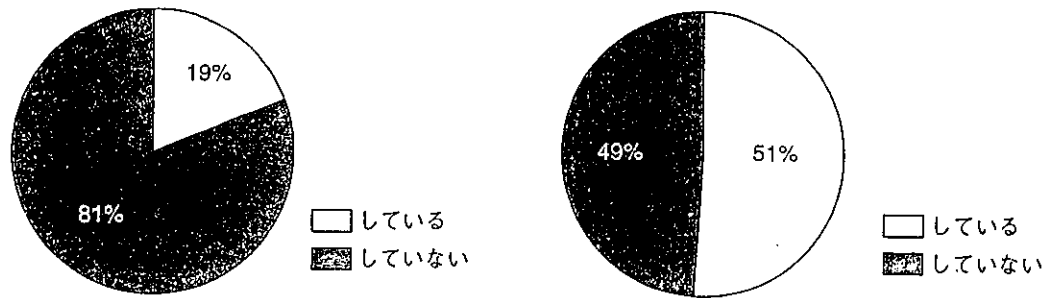


図 11 救命救急領域における PCPS

あることも関与している。したがって、心機能の改善不良例に対しては直接的な心補助効果が得られる VAS への移行を検討することが必要である。また、心臓死以外では、適応時における全身状態に起因するものもあり、今後の検討課題である。

近年施行数が増大している救命救急領域での使用について検討すると、まず救命救急センターとして PCPS の開始基準を作成している施設は 19% であった。また、院外心停止症例に対し、心肺蘇生法として PCPS を施行している施設は半数の 51% であった (図 11)。PCPS 装着理由をみると 66% は心肺停止例で、21% が循環不全、8% が呼吸不全、5% がその他の症例であった (p.30 図 1 参照)。

救命救急領域での心疾患に対する適応 337 例を検討すると、急性心筋梗塞が半数の 48% を占め、他は、重症不整脈、急性心筋炎、急性大動脈解離・大動脈破裂、心破裂、DC 抵抗性心室細動などであった (p.30 図 2 参照)。呼吸器疾患に基づくものは 49 例で、大部分は肺血栓塞栓症が占めており、他は ARDS、気管支喘息であった (p.30 図 3 参照)。また、その他の症例 221 例では、大部分が院外心停止症例 (78%) で、他は偶発低体温およびその他であった (p.30 図 4 参照)。

救命救急領域での 2000～2002 年における生存率をみると、全体では 30% であった (p.31 図 5 参照)。その中で、急性心肺不全は 29% であった。また、心臓関連では、心破裂が 21% と低く、急性心肺不全、重症不整脈、急性大動脈解離・大動脈破裂は 30% 前後、DC 抵抗性心室細動は 39% であったが、急性心筋炎は 53% と半数が生存した。呼吸器関連では、肺血栓塞栓症、ARDS が各々 42%、38% であり、気管支喘息も 33% と全体の成績より良好であった。また、院外心停止例においても 32% が生存しており、偶発的の低体温では 58% と良好な成績であった。今後救命救急領域での PCPS の適応について検討を加えることが重要と考えられた。

4

まとめ

本邦で広く用いられている流量補助手段である PCPS の現況に関するアンケート調査が PCPS 研究会により行われた。PCPS の施行数は増加傾向にあり、特に救命救急領域での使用数が増加している。生存率はこの 3 年間向上しており、45% 前後となり、急性