

分担研究者田畑が in vitro およびマウスにおける分解性試験を実施し、基礎研究なら



図 1. 凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシート

びに、先の臨床試験と同等の性能を示すことが確認された。また、分担研究者丸井によるウサギを用いた試験においても同等の結果が得られた。また、イヌを用いた安全制試験は現在進行中であり、効果についても評価を行う予定である。なお、試験薬製造に関する文書については、すべて治験薬 GMP に従って管理を行った。

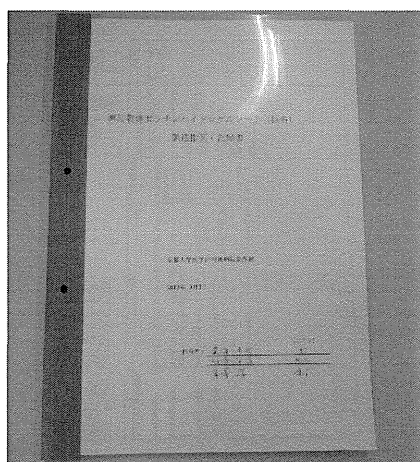


図 2. 製造指図・記録書

D. 考察

臨床試験の実施にあたり、使用する試験物の安全性ならびに品質の担保は必須である。治験薬に関する文書に従って、治験薬 GMP グレードの無菌製剤室において、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートを製造し、その評価を行った。本製造品はこれま

での前臨床試験ならびに先の臨床試験の凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルとの同等性が示された。さらに継続中の安全性試験ならびに有効性試験を行い、計画中の臨床試験での使用していく予定である。なお、本製造についてすべて治験薬 GMP 管理で記録を残しており、臨床試験成績の導出の際にも試験薬製造工程等のノウハウをパッケージとして提出可能である。

E. 結論

本製造の凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートは非臨床試験や前臨床試験の試験薬と同等であることが明らかとなり、計画中の臨床試験で応用が可能であると判断された。

F. 研究発表

1. 論文発表
 1. 岡真千子, 米澤淳, 豊国秀昭, 乾賢一, 桂敏也 治験薬 GMP に基づいた臨床試験用院内無菌製剤室の設置と適合性評価 医療薬学 38(7) 423-434, 2012
 2. 米澤淳 トランスレーショナルリサーチへの薬剤師の新たなかわり 治験薬 GMP 基準の特殊無菌製剤室の設置 ファルマシア 49(2): 103-105, 2013
2. 学会発表
 1. 米澤淳、桂敏也；学術シンポジウム 5 「院内製剤の果たす役割と将来展望」 治験薬 GMP に準拠した院内特殊無菌製剤室の設置とトランスレーショナルリサーチ、日本薬剤学会第 27 年会 2012 年 5 月 25 日 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧

書籍

1. 丸井 晃、坂田隆造 ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 古くて新しいドラッグデリバリーシステム(DDS) 第2章 徐放技術の医療応用 3.再生医療 2)血管 メディカルドゥ 143-7
2. 坂田隆造 編集 心臓外科 Knack & Pitfalls 冠動脈外科の要点と盲点 第2版 文光堂 2012年10月1日発行
3. Masumoto H, Yamashita JK. Pluripotent stem cells for cardiac cell therapy: the application of cell sheet technology. Pluripotent Stem Cells / Book 1, ISBN 980-953-307-708-1, InTech, In press.

雑誌

1. 坂田隆造 新規医療技術開発の法的・制度的枠組みⅡ. 高度医療から保険医療へ事例紹介: bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる心血管再生. 臨床評価 2012;40(Suppl XXXI):178-81.
2. 血管炎の血管新生療法と免疫療法 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用いた血管新生療法 丸井晃、坂田隆造 日本臨床 71 巻 Page 464-9
3. 丸井 晃、岡林 均、小宮達彦、坂田隆造 エビデンスに基づく至適冠血行再建—CREDO-Kyoto からの検証— 日本心臓血管外科学会雑誌 2013;Vol.42,No.1:16-22
4. 南方謙二、坂田隆造 循環器学 2012 年の進歩 冠疾患学研究の進歩 - 外科系の進歩 - 日本循環器学会専門医誌 循環器専門医 第 20 巻第 2 号 南江堂 2012;20:320-323.
5. 村山 敏典、西村 浩美、南 学、横出 正之 自主臨床試験の健康被害補償に関する検討. 臨床薬理(0388-1601)43 巻 Suppl. PageS233(2012.10)
6. 岡真千子、米澤淳、豊国秀昭、乾賢一、桂敏也 治験薬GMPに基づいた臨床試験用院内無菌製剤室の設置と適合性評価 医療薬学 38(7) 423-434, 2012
7. 米澤淳 トランスレーショナルリサーチへの薬剤師の新たなかわり 治験薬GMP基準の特殊無菌製剤室の設置 ファルマシア 49(2): 103-105, 2013
8. Marui A, Okabayashi H, Komiya T, Tanaka S, Furukawa Y, Kita T, Kimura T, Sakata R; The CREDO - Kyoto Investigators. Benefits of off - pump coronary artery bypass grafting in high - risk patients: A propensity - score analysis. Circulation. 2012;126:S151-7.
9. Nakano J, Okabayashi H, Noma H, Sato T, Sakata R. Early angiographic evaluation after off - pump coronary artery bypass grafting. J Thorac Cardiovasc Surg, in press
10. Marui A, Kimura T, Tanaka S, Okabayashi H, Komiya T, Furukawa Y, Kita T, Sakata R; CREDO - Kyoto Investigators. Comparison of Frequency of Postoperative Stroke in Off - Pump Coronary Artery Bypass Grafting versus On - Pump Coronary Artery Bypass Grafting versus Percutaneous Coronary Intervention. Am J Cardiol. 2012;110:1773-8.
11. Minakata K, Bando K, Takanashi S, Konishi H, Miyamoto Y, Ueshima K, Sato T, Ueda Y, Okita Y, Masuda I, Okabayashi H, Yaku H, Yasuno S, Muranaka H, Kasahara M, Miyata S, Okamura Y, Nasu M, Tanemoto K, Arinaga K, Hisashi Y, Sakata R; JMAP Study Investigators. Impact of diabetes mellitus on outcomes in Japanese patients undergoing coronary artery bypass grafting. J Cardiol. 2012;59:275-84.
12. Marui A, Kimura T, Tanaka S, Furukawa Y, Kita T, Sakata R; CREDO - Kyoto Investigators. Significance of off - pump coronary artery bypass grafting compared with percutaneous coronary intervention: a propensity score analysis. Eur J Cardiothorac Surg. 2012;41:94-101.
13. Minakata K, Yamazaki K, Miwa S, Funamoto M, Kumagai M, Marui A, Sakata R. Ventricular Approach for Functional Mitral Regurgitation in Cardiomyopathy. World Journal of Cardiovascular Surgery. 2013;3,8-14.

14. Nakano J, Okabayashi H, Noma H, Sato T, Sakata R. The impact of incomplete revascularization and angiographic patency on midterm results after off-pump coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*, in press
15. Toyota T, Furukawa Y, Ehara N, Funakoshi S, Morimoto T, Kaji S, Nakagawa Y, Kadota K, Iwabuchi M, Shiomi H, Yamamuro A, Kinoshita M, Kitai T, Kim K, Tani T, Kobori A, Kita T, Sakata R, Kimura T; on behalf of the CREDO-Kyoto Investigators. Sex-Based Differences in Clinical Practice and Outcomes for Japanese Patients With Acute Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Circ J*. 2013, in press
16. Natsuaki M, Furukawa Y, Morimoto T, Sakata R, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Renal function and effect of statin therapy on cardiovascular outcomes in patients undergoing coronary revascularization (from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). *Am J Cardiol*. 2012 110:1568-77
17. Shiomi H, Morimoto T, Hayano M, Furukawa Y, Nakagawa Y, Tazaki J, Imai M, Yamaji K, Tada T, Natsuaki M, Saijo S, Funakoshi S, Nagao K, Hanazawa K, Ehara N, Kadota K, Iwabuchi M, Shizuta S, Abe M, Sakata R, Okabayashi H, Hanyu M, Yamazaki F, Shimamoto M, Nishiwaki N, Imoto Y, Komiya T, Horie M, Fujiwara H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Comparison of long-term outcome after percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with unprotected left main coronary artery disease (from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). *Am J Cardiol*. 2012;110:924-32
18. Natsuaki M, Furukawa Y, Morimoto T, Nakagawa Y, Ono K, Kaburagi S, Inada T, Mitsuoka H, Taniguchi R, Nakano A, Kita T, Sakata R, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG registry cohort-2 investigators. Intensity of statin therapy, achieved low-density lipoprotein cholesterol levels and cardiovascular outcomes in Japanese patients after coronary revascularization. Perspectives from the CREDO-Kyoto registry cohort-2. *Circ J*. 2012;76:1369-79
19. Tokushige A, Shiomi H, Morimoto T, Furukawa Y, Nakagawa Y, Kadota K, Iwabuchi M, Shizuta S, Tada T, Tazaki J, Kato Y, Hayano M, Abe M, Ehara N, Inada T, Kaburagi S, Hamasaki S, Tei C, Nakashima H, Ogawa H, Tatami R, Suwa S, Takizawa A, Nohara R, Fujiwara H, Mitsudo K, Nobuyoshi M, Kita T, Kimura T; CREDO-Kyoto PCI/CABG registry cohort-2 investigators. Incidence and outcome of surgical procedures after coronary bare-metal and drug-eluting stent implantation: a report from the CREDO-Kyoto PCI/CABG registry cohort-2. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012;5:237-46
20. Masumoto H, Sakata R. Cardiovascular surgery for realization of regenerative medicine. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;60:744-55.
21. Masumoto H, Matsuo T, Yamamizu K, Uosaki H, Narazaki G, Katayama S, Marui A, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK. Pluripotent stem cell - engineered cell sheets reassembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte - mediated neovascularization. *Stem Cells*. 2012;30:1196-205.
22. Sakata-Goto T, Takahashi K, Kiso H, Huang B, Tsukamoto H, Takemoto M, Hayashi T, Sugai M, Nakamura T, Yokota Y, Shimizu A, Slavkin H, Bessho K. Id2 controls chondrogenesis acting downstream of BMP signaling during maxillary morphogenesis. *Bone* 2012 50(1) 69-78.
23. Nambu, Y., Hayashi, T, Jang K.J, Aoki K, Mano H, Nakano K, Osato M, Takahashi K, Itoh K, Teramukai S, Komori T, Fujita J, Ito Y, Shimizu A, Sugai M. In situ differentiation of CD8 $\alpha\alpha$ T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. *Scientific Reports* 2012 2 642.

24. Morimoto N, Ito T, Takemoto S, Katakami M, Kanda N, Tada H, Tanaka S, Teramukai T, Kawai K, Nakamura Y, Kasai Y, Yokode M, Maekawa T, Shimizu A, Suzuki S. An exploratory clinical study on the safety and efficacy of an autologous fibroblast-seeded artificial skin cultured with animal product-free medium in patients with diabetic foot ulcers. *International Wound Journal*, 2012 doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01064.x.
25. Yamamoto K, Yamanaka K, Hatano E, Sumi E, Ishii T, Taura K, Iguchi K, Teramukai S, Yokode M, Uemoto S, Fukushima M. An eClinical trial system for cancer that integrates with clinical pathways and electronic medical records. *Clin Trials*.2012;9(4):408-417.
26. Morimoto N, Yoshimura K, Niimi M, Ito T, Tada H, Teramukai S, Murayama T, Toyooka C, Takemoto S, Kawai K, Yokode M, Shimizu A, Suzuki S. An exploratory clinical trial for combination wound therapy with a novel medical matrix and fibroblast growth factor in patients with chronic skin ulcers: a study protocol. *Am J Transl Res*. 2012; 4(1):52-59.
27. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 Deficiency Reduces the Progression of Atherosclerotic Plaque in ApoE(-/-) Mice. *J Am Heart Assoc*. 2012; 1(6):e003376.
28. Yamamoto K, Sumi E, Yamazaki T, Asai K, Yamori M, Teramukai S, Bessho K, Yokode M, Fukushima M. A pragmatic method for electronic medical record-based observational studies: developing an electronic medical records retrieval system for clinical research. *BMJ Open*. 2012;2(6). doi:pii: e001622.

IV. 研究成果の刊行物・別刷

3. 再生治療 2) 血管

丸井 晃・坂田隆造

要旨

虚血性心疾患や重症下肢虚血に対し、遺伝子導入や細胞移植による血管新生療法が行われているが、現時点では有用性が十分に証明されておらず、確立された治療法には至っていない。われわれは血管新生療法の新たな方策として、生体材料であるゼラチンハイドロゲルをDDSに応用した。塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）徐放化ゼラチンハイドロゲルは臨床試験で安全かつ優れた血管新生効果を示しており、手技も簡便で低コストであった。現在、高度医療評価制度などの医療制度の利用や、企業との連携を強化し、将来的な製品化や保険診療化をめざしてプロジェクトを進めている。

キーワード 血管新生療法、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、ゼラチンハイドロゲル、虚血性心疾患、重症下肢虚血

● はじめに ●

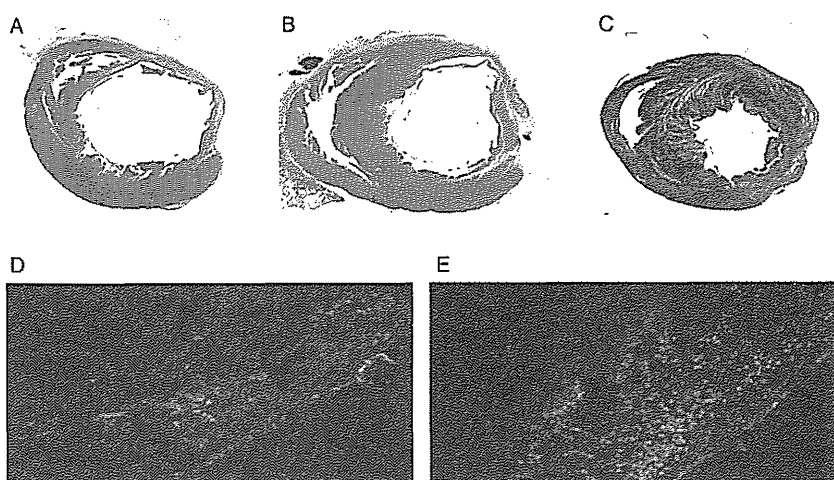
虚血性心疾患や重症下肢虚血に対する血管新生療法が近年脚光を浴びており、すでに国内外で遺伝子導入や細胞移植による血管新生療法が行われている。しかし現時点では、プラセボ群を置いたランダム化比較試験での有効性が証明されておらず、いまだに治療法として確立していない。また、これらの方法によって形成される新生血管の成熟度や永続性、虚血部で活性化すべき血管新生タンパクの組み合わせなどについては不明な点が多く残されている。さらに臨床への応用にあたっては、臨床効果の客観的な評価法や承認に至るまでの医療制度への対策、従来の薬物療法やカテーテル治療・外科手術との位置づけなど、多くの課題が残されている。われわれは遺伝子導入や細胞移植とは別のアプローチとして、生体吸収性材料のゼラチンを用いた細胞増殖因子のドラッグデリバリーシステム（DDS）を血管新生療法に応用しており、ここではその心臓血管外科領域における試みを紹介する。

I. 様々な血管新生療法

現在臨床では主として細胞増殖因子タンパク・遺伝子導入・細胞移植による血管新生療法が行われている。タンパク治療は組織再生を促す増殖因子タンパクを投与し、遺伝子治療は増殖因子タンパクをコードした遺伝子をウイルスベクターもしくはプラスミドDNAなどにより投与する。細胞移植治療は、骨髄幹細胞・間葉系幹細胞などを移植することによって血管新生を促す。

しかし、タンパク治療では通常高濃度の増殖因子の反復投与を必要とする点、遺伝子治療ではウイルスやプラスミドなどの遺伝材料の短期・長期的な安全性が懸念される点、増殖因子の徐放コントロール性を十分にもったベクターがいまだ存在しない点、目的臓器以外での遺伝情報の発現などの問題点も指摘されている¹⁾。細胞移植治療においても、自己骨髄幹細胞移植では細胞採取時に全身麻酔を必要とし、細胞種の適否、免疫反応、十分な細胞数の確保などの問題もいまだ解決されていない。また、細胞の採取・培養・管理などにかかるコストは細胞

図① 心筋芽細胞移植前の心筋梗塞巣へのbFGF徐放による血管新生誘導 (prevascularization) の有効性 (文献8より)



細胞移植4週後では、細胞移植のみの群ではほとんどの移植細胞は傍梗塞領域に観察されたのみであったが (D)、bFGFによる血管新生誘導の後に細胞移植をした群では梗塞領域を含むすべての瘢痕領域に移植細胞が観察された (E)。心筋梗塞壁は細胞移植群、bFGF群 (B)、bFGFによる血管新生誘導+細胞移植群 (C) では壁厚を保っていたが、コントロール群 (A) では壁が薄剥化していた。

A-C. HE (hematoxylin and eosin) 染色
D, E. PKH26蛍光染色

(グラビア頁参照)

移植治療の課題となっている。

II. 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルによるDDS

そこでわれわれは新たなアプローチとして生体吸収性材料のゼラチンから作製した「ゼラチンハイドロゲル」をDDSに応用した⁹⁾。ゼラチンハイドロゲルは酸性ゼラチンを化学架橋して作製する。ゼラチンハイドロゲルは生理活性を保ったままサイトカインを静電気力により吸着し、これを生体内に投与するとゼラチンハイドロゲルが生体内で分解されるにしたがい増殖因子の効果が発現する。

この方法の最大の利点はゼラチンハイドロゲルの生体吸収性であり、臨床における安全性が期待できる点である。ゼラチンはすでに臨床応用されている材料であり、生体内で分解された後、生体に毒性のないアミノ酸になる。またゼラチンハイドロゲルは、タンパクの発現の時期・濃度をきめ細かくコントロールでき、シート状・ディスク状・粒子状などの成形が可能で応用箇所の幅が広く、様々なタンパクを組み合わせでの徐放投与が可能である (DDSにおける幅広い応用性)。さらに、細胞移植・遺伝子治療と比べて患者投与までの手技が非常に簡便で低コストであり、実施可能性という点でも臨床向きといえる。

III. 心臓血管外科領域におけるゼラチンハイドロゲルの応用

1. 基礎研究

われわれは、ゼラチンハイドロゲルから優れた血管新生・組織再生因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) などを徐放させることにより、様々な動物実験で有効性を証明してきた。bFGFはFGFファミリーに属する人体に広く分布する強力な血管新生・組織再生因子であり、血管新生 (angiogenesis) のみならず動脈形成 (arteriogenesis, 小動脈レベルの血管拡張, リモデリング) を促進する特色をもつ。さらにbFGFは血管内皮増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) などの増殖因子をupregulateする特徴をもっている。例を挙げると、虚血性心疾患における血管新生・心機能回復¹¹⁾、細胞移植治療前の血管新生誘導⁸⁾ (図①)、胸骨感染後の骨再生促進⁹⁾ (図②)、重症下肢虚血に対する血管新生^{10) 16)}、肺高血圧症治療¹⁷⁾、人工臓器感染予防¹⁸⁾など、非常に多くの領域での有効性を確認してきた。

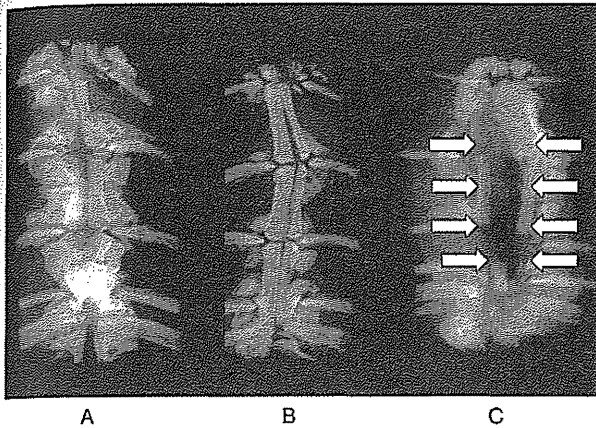
2. 臨床研究

さらにこれらの結果を踏まえ、虚血性心疾患および重症下肢虚血に対して臨床試験を行った。

(1) 虚血性心疾患

薬物治療が無効な虚血性心疾患に対する治療法としてカテーテルインターベンションや冠動脈バイパス手術 (CABG) が行われているが、冠動脈がびまん性に狭窄している症例や重症虚血性心筋症に対しては有効性に限

図② 糖尿病ラットの胸骨正中切開，両側内胸動脈剥離
4週間後の胸骨X線写真(文献9より)



- A. bFGF治療群では著明な胸骨再生がみられる。
B. 無治療群では胸骨治癒が遅延している。
C. 胸骨感染による胸骨離開・破壊像(矢印)

界がある。腹腔内臓器の大網は豊富な血流をもち、また種々の増殖因子を放出することで知られている。われわれはウサギの鈍縁枝を結紮した急性⁶⁾および慢性心筋梗塞モデル⁷⁾を作製し、梗塞部にbFGF徐放化ゼラチンシートを塗布し、その上から有茎大網を胃大網動脈ごと梗塞部に巻きつけたところ、豊富な血管新生と胃大網動脈か

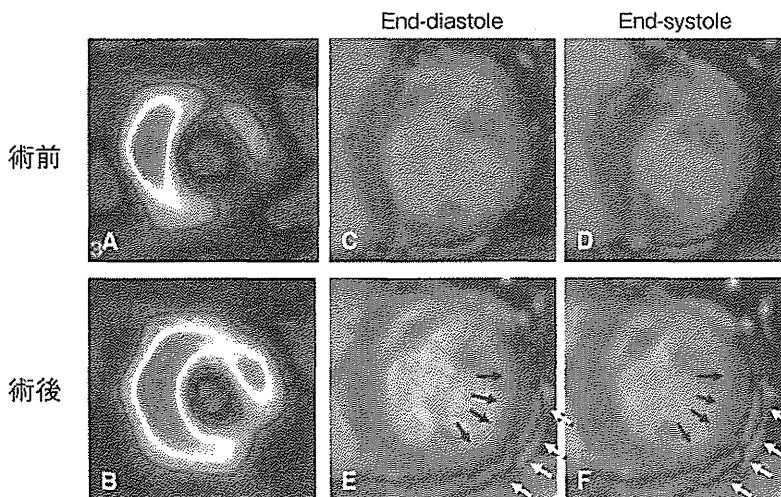
ら可視可能な側副血管を介して直接鈍縁枝に流入する血流を確認した。また大網からの複数のサイトカインの経時的協調作用が心機能の著明な改善に寄与していることを示した。

われわれはこの血行再建法を生物学的バイパス吻合(バイオCABG)と命名し、血行再建不可能なびまん性虚血領域をもつ患者に応用した¹⁰⁾。bFGFは皮膚科領域で褥瘡治療薬として製造販売されているbFGFスプレー製剤(フィブラストスプレー[®])を使用した。手術は通常のCABGに加えてバイオCABGを行った。術後血管造影では胃大網動脈から直接に流入する血流を確認し、さらにMRIによる局所心機能の改善と心筋シンチグラフィによる血流の改善を確認した(図③)。

(2) 重症下肢虚血

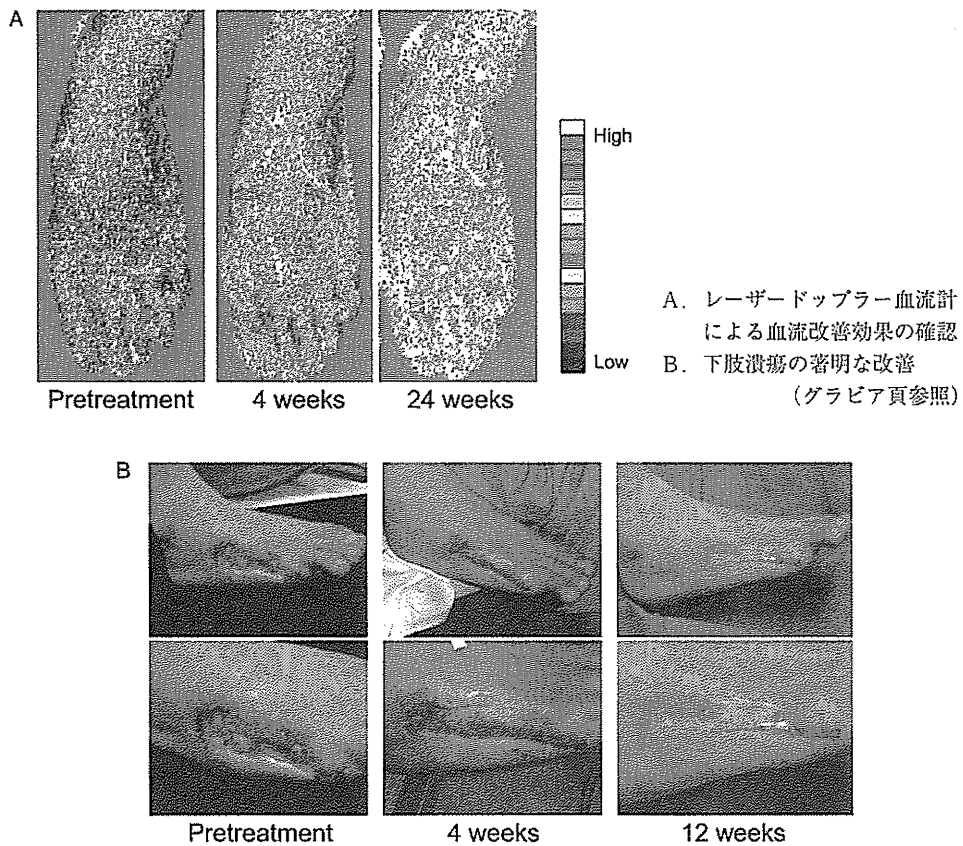
下肢動脈の閉塞による末梢性動脈疾患は、下肢の冷感・しびれや歩行距離の減少にて発症し、進行すると慢性疼痛や下肢潰瘍を合併する。カテーテル治療や外科的バイパス手術が適応となるが十分な効果が得られないこともあり、重症例では下肢切断となることも多く、患者のQOLに非常に影響する疾患である。われわれはウサギ大腿動脈を結紮し下肢虚血モデルを作製し、bFGF徐放化ゼラチンハイドロゲル粒子の大腿部筋肉内注射を行ったところ、投与4週後に血流改善効果ならびに組織像でも有意な血管新生を認めた¹³⁾。

図③ バイオCABGによる血管新生(文献19より)



- A, B. タリウムSPECT (短軸像)。ストレス時の左室側壁～下壁の血流がバイオCABGにより改善している。
C-F. シネMRIによる拡張末期および収縮末期像(短軸像)。白矢印:bFGF徐放化シートと大網を塗布した部分(バイオCABG)。黒矢印:拡張期および収縮期ともに心筋壁厚が改善している。(グラビア頁参照)

表④ 重症下肢虚血に対する血管新生療法(文献20より)



さらに、その有用性を検証すべく閉塞性動脈硬化症 (ASO) 3名、バージャー病4名、計7名の重症下肢虚血患者に対して第I-II相臨床試験を行った²⁰⁾。bFGF徐放化ゼラチンハイドロゲル粒子200 μ gを腰椎麻酔下に重症下肢虚血患者の下腿を中心に40カ所筋肉内投与を行い (単回投与)、4週・24週後に臨床効果の評価を行った。投与時間はbFGF徐放化ゼラチンハイドロゲルの準備時間を含めて約1時間程度であった。7症例の経験では明らかな有害事象は認めず、有効性評価としては、潰瘍を有した6例中3例で潰瘍消失、1例で縮小を認めた。また6分間歩行距離・疼痛スコアおよび経皮的酸素分圧 (TcO₂)・Laser Doppler血流計での評価血流は4週後・24週後ともに有意に改善した (図④) また、局所効果の指標であるbFGFの血中濃度の有意な上昇も認めなかったことから、この手法が優れたDDSであることが示唆された。

IV. 薬事承認・保険診療化に向けて

以上の試みにより、bFGF徐放化ゼラチンハイドロゲルの有効性が示唆されたが、製剤の市販化・薬事承認までにはまだ多くのハードルが存在するのも事実である。市販化をめざすためには治験が必要であり、治験には技術的・資金的にも企業との連携が不可欠であるが、相応の臨床実績および有効性のデータがなければ企業も手を出しにくく、一朝一夕に契約合意に至ることは現実には困難である。

そこでわれわれは厚生労働省の「第三項先進医療 (高度医療評価制度)」に着目した。薬事法承認が得られていない医薬品・医療機器の使用を伴う先進的な医療技術については、現時点では原則として保険との併用が認められていない。そこで高度医療評価制度は、これらの医療技術のうち一定の要件下に行われるものについて保険診療との併用を認め、薬事法による申請などにつながる科学的評価可能なデータ収集の迅速化を図ることを目的

として2008年4月に創設された。

今回、前述の重症下肢虚血患者に対する第I-II相臨床試験をさらに進め、bFGF（フィブラストスプレー®）の効能外使用を含む高度医療評価制度の下で、保険医療に向けた臨床試験を開始した。対象患者は先行試験同様に重症下肢虚血のASOおよびパージャージャー病患者で、bFGF徐放化ゼラチンハイドロゲルの安全性および有効性を評価することを目的としている。

また今回の高度医療では、将来実施する予定の治験を勘案し、ゼラチンハイドロゲルの製造を「治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬GMP）」に準じて調製を行っている。治験薬GMPとはgood manufacturing practiceの略で、医薬品や医療用具、食品などの安全性を含む品質保証の手段として、工場などの製造設備（ハード）およびその品質管理・製造管理（ソフト）についての基準であり、臨床治験に使用する薬剤は、治験薬GMP基準を満たしていることが要求される。今回の試験では京都大学薬剤部にGMP基準に則った特殊無菌製剤室を設置し、製造の手順書および記録書の整備、無菌試験や安定性試験などの品質管理項目を設定し、安全で高品質な試験薬を製造している。高度医療評価制度下での新規臨床研究はすでに患者登録が終了しており、2012年以内に結果を報告予定である。

● おわりに ●

再生医療の先駆けとして脚光を浴びた血管新生療法であるが、残念ながら製品化・保険診療化されたものは現時点では存在しない。血管新生療法には様々なアプローチがあるが、組織再生や臓器再生と比較して血管新生というシンプルな現象を誘導するには、同等の効果が得られるなら細胞移植や遺伝子治療よりも安全・簡便かつ低コストと考えられるゼラチンハイドロゲルのようなDDSがより臨床応用に近いと思われる。

今後は臨床での応用を視野に入れ、各疾患の適切な増殖因子の選択・至適投与量・徐放期間・投与法の検証を重ね、また臨床効果の標準的評価法を確立する必要がある。さらに医薬品としての承認に至るには企業との提携が不可欠であり、企業参加を促すためにも、高度医療評価制度などの制度を最大限に活用した実績作りと、科研費などのナショナルグラントなどを獲得することにより、その手法の先進性・有望性を公的に示すことも産学連携の強化につながると思われる。今後は安全性に最大限配慮しつつもなるべく早期の臨床応用をめざすことが、難治性疾患に苦しむ多くの患者の方々の救済に必要不可欠と考える。従来の遺伝子治療・細胞移植治療に加えて、このゼラチンハイドロゲルでのDDSが今後の再生医療の一領域として発展していくことを願っている。

参考文献

- 1) Epstein SE, Fuchs S, et al : Cardiovasc Res 49, 532-542, 2001.
- 2) Simons M, Bonow RO, et al : Circulation 102, E73-86, 2000.
- 3) Tabata Y, Hijikata S, et al : J Control Release 31, 189-199, 1994.
- 4) Nakajima H, Sakakibara Y, et al : J Artif Organs 7, 58-61, 2004.
- 5) Sakakibara Y, Tambara K, et al : Eur J Cardiothorac Surg 24, 105-111, 2003, discussion 112.
- 6) Ueyama K, Bing G, et al : J Thorac Cardiovasc Surg 127, 1608-1615, 2004.
- 7) Takaba K, Jiang C, et al : J Thorac Cardiovasc Surg 132, 891-899, 2006.
- 8) Sakakibara Y, Nishimura K, et al : J Thorac Cardiovasc Surg 124, 50-56, 2002.
- 9) Iwakura A, Tabata Y, et al : Circulation 104(12 Suppl 1), 1325-329, 2001.
- 10) Kanematsu A, Marui A, et al : J Control Release 99, 281-292, 2004.
- 11) Marui A, Kanematsu A, et al : J Vasc Surg 41, 82-90, 2005.
- 12) Hirose K, Fujita M, et al : Circ J 70, 1190-1194, 2006.
- 13) Doi K, Ikeda T, et al : Heart Vessels 22, 104-108, 2007.
- 14) Arai Y, Fujita M, et al : Circ J 71, 412-417, 2007.
- 15) Bir SC, Esaki J, et al : J Vasc Surg 50, 870-879, 2009.
- 16) Bir SC, Esaki J, et al : J Vasc Res 48, 195-205, 2010.
- 17) Hirose K, Marui A, et al : J Thorac Cardiovasc Surg 136, 1250-1256, 2008.
- 18) Hirose K, Marui A, et al : J Vasc Surg 44, 377-382, 2006.
- 19) Marui A, Komeda M, et al : J Thorac Cardiovasc Surg 138, 775-777, 2009.
- 20) Marui A, Tabata Y, et al : Circ J 71, 1181-1186, 2007.

●丸井 晃

1994年 京都大学医学部卒業

2005年 同大学院医学研究科博士課程修了

同医学部附属病院心臓血管外科助教

2009年 同医学部附属病院探索医療センター准教授



1. CABG の現況

坂田隆造

[京都大学医学部附属病院心臓血管外科]

◆はじめに

冠動脈バイパス術 coronary artery bypass grafting (CABG) は、1967年 Cleveland Clinic の Favaloro らによって初めて行われ、本邦でも1970年に瀬在らの最初の報告があった。以来、社会の高齢化や生活様式の西洋化などの影響で虚血性心疾患患者数は増大し、これに伴い CABG 症例数も増加して現在では心臓血管外科手術の中で最も症例数の多い術式となっている。

2005年に本書の第1版が上梓され5年経った。この間、人工心肺を用いない off-pump CABG (OPCAB) の普及や経皮的冠動脈インターベンション percutaneous coronary intervention (PCI) における薬剤溶出性ステント drug eluting stent (DES) の臨床使用開始があり、CABG を取り巻く環境は大きく変化してきた。

本邦における CABG の現況を日本胸部外科学会の2009年々次集計で分析する。

◆1. 症例数

単独 CABG の年度別手術件数の年次推移を図1に示す。2003年までは右肩上がりで症例数を伸ばしていたが、2004年に大きく減少し、ここ数年は17,000例で推移している。これは先述した DES が本邦でも臨床使用が可能となった時期と一致する。DES の出現により治療方針が少なからず影響を受けた結果といえよう。

ただし、弁膜症と同時手術として行われた CABG が2003年の1,506例と比較して2009年

には2,936例と倍増しており、総 CABG 症例数は20,000例前後で大きな変化は見られない。CABG 症例の重症化を示すものといえよう。

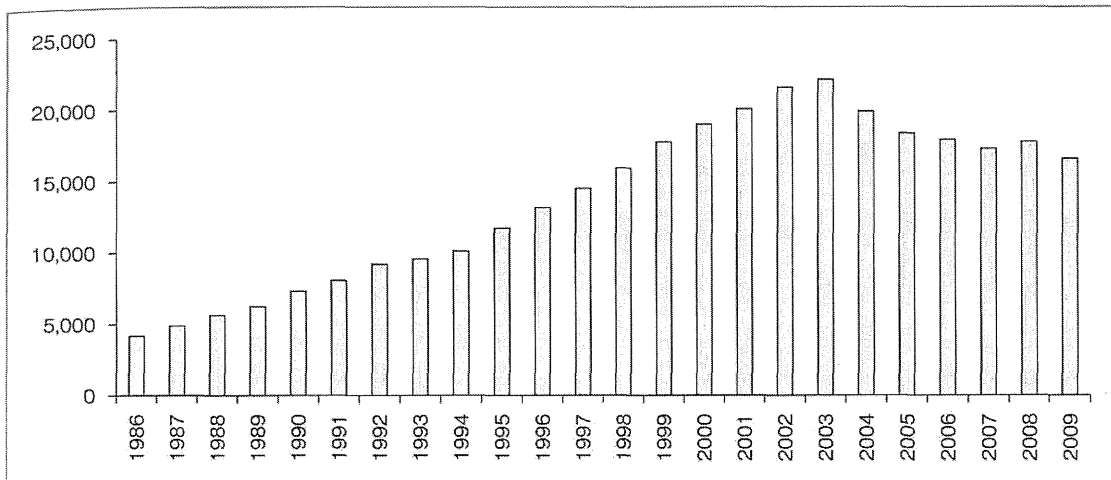
◆2. on-pump vs. OPCAB

OPCAB は人工心肺使用や大動脈遮断による脳合併症は回避できるという点で on-pump CABG より優位とされる。OPCAB 症例は、2000年には約25%でその後漸増していたが、2005年以降は約60%で推移している(図2)。ただし2009年では6,184例の on-pump CABG のうち約3分の1の1,867例が心拍動下に行われており(表1)、全体の約70%の症例は心拍動下に行われていた。OPCAB のデバイスの進歩に加え心拍動下手術経験と吻合技術の向上が寄与しているものと思われる。

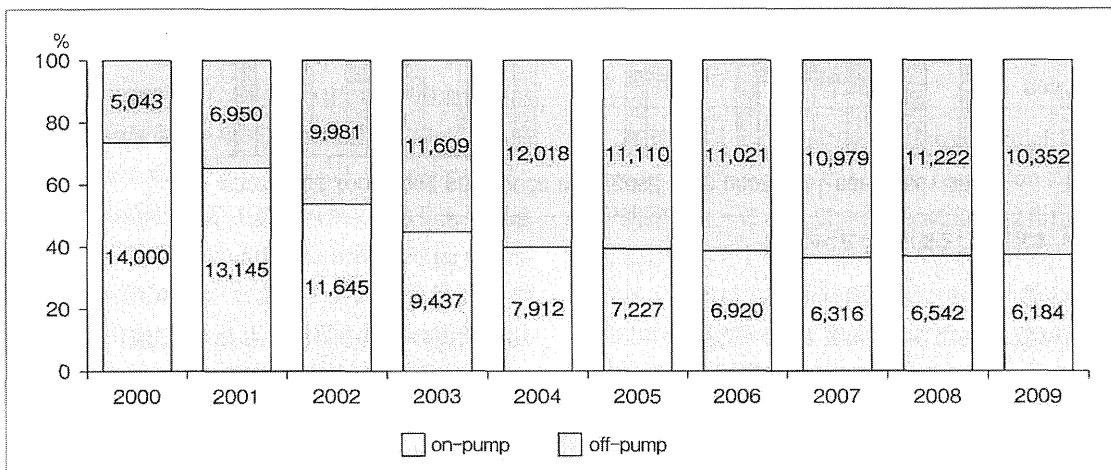
◆3. 使用グラフト

使用グラフトの推移(図3)は、OPCAB の増加と歩調を合わせるように動脈グラフトのみの症例が増加し、2000年前半には全症例の半数を超えていた。aorta non touch による動脈グラフト使用増加と思われるが、その後徐々に減少し2009年には全症例の27%となり、代わりに動脈グラフトと静脈グラフトの組み合わせ症例が約7割まで再増加している。OPCAB 症例で、auto-suture 法を含めた吻合法の確立で安全に中枢吻合が施行できるようになったことが要因の一つと考えられる。

- ◎年々増加していた単独 CABG 症例は DES の普及により減少した。
- ◎OPCAB の比率が高く、その成績も良好である。
- ◎グラフトは、動脈+静脈グラフト症例が多い。



【図1】 本邦における単独 CABG 症例数の変遷



【図2】 本邦における on-pump と off-pump CABG (OPCAB) の症例数と割合の変遷

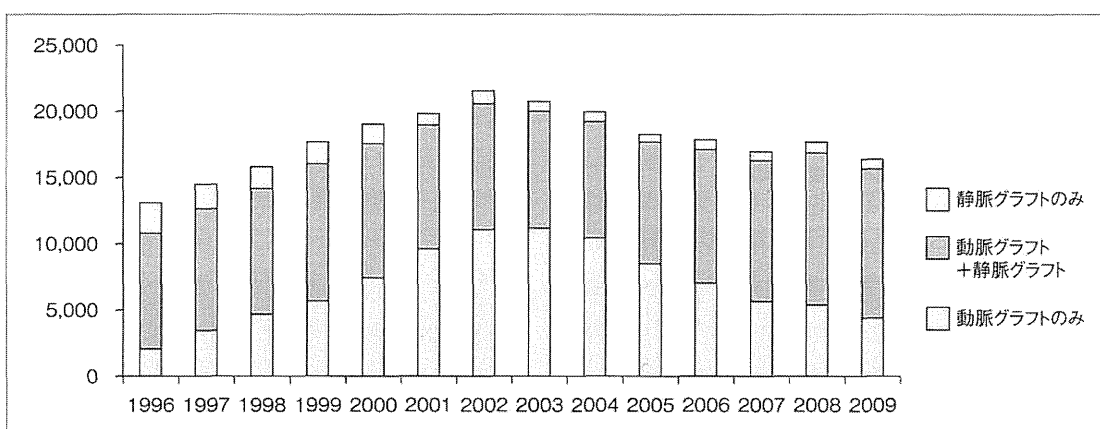
◆ 4. 手術成績

単独 CABG の病院死亡率は 1990 年代後半では 3~4% で推移していたが、2002 年に初めて 3% を割り 2009 年には 2.3% にまで低下した。このうち待機手術の病院死亡率は 1.3% と良好であっ

たのに対し、緊急手術では 8.0% と依然として高い死亡率であった。待機手術の人工心肺の有無では、初回手術の病院死亡率は on-pump arrest 1.1%、on-pump beating 2.7%、OPCAB 1.1% と良好で、再手術症例でもそれぞれ 4% 前後であった。待機手術においてはいずれの方法であっても

[表1] 本邦における2009年の単独CABGの各症例数と病院死亡数・死亡率

on-pump arrested CABG (4,317 症例)							
初回・待機		初回・緊急		再手術・待機		再手術・緊急	
症例	病院死亡	症例	病院死亡	症例	病院死亡	症例	病院死亡
3,605	40 (1.1%)	633	54 (8.5%)	65	3 (4.6%)	14	1 (7.1%)
on-pump beating CABG (1,867 症例)							
初回・待機		初回・緊急		再手術・待機		再手術・緊急	
症例	病院死亡	症例	病院死亡	症例	病院死亡	症例	病院死亡
1,271	34 (2.7%)	526	59 (11.2%)	52	2 (3.8%)	18	2 (11.1%)
off-pump CABG (10,352 症例)							
初回・待機		初回・緊急		再手術・待機		再手術・緊急	
症例	病院死亡	症例	病院死亡	症例	病院死亡	症例	病院死亡
8,927	96 (1.1%)	1,239	78 (6.3%)	166	5 (4.2%)	20	2 (10.0%)



[図3] 本邦における使用グラフトの変遷

成績は安定している(表1)。一方、術中 on-pump conversion となった症例が2009年に214例あり、そのうち待機手術に限っても病院死亡率は4.2%と高いことも事実であり、「on-pump 症例の適応」を十分踏まえたうえでの治療法選択が重要である。

◆おわりに

以上見てきたように、より低侵襲で臨床効果の

高い治療の提供を目標とした OPCAB や DES の普及が CABG に与えた影響は少なくない。今後、robotic surgery や distal auto-suture technique などに代表される新たなテクニックやテクノロジーの開発が重要であり、それらの普及により CABG もまた大きく変化していくものと思われる。

bFGF徐放化ゼラチンハイドロゲルによる心血管再生

Regenerative medicine by sustained release of bFGF using gelatin hydrogel in Cardiovascular Field



坂田 隆造

Ryuzo Sakata

京都大学大学院医学研究科器官外科学講座心臓血管外科学 教授
Professor, Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine

1. 下肢虚血の重症度と生存率

bFGF (basic fibroblast growth factor: 塩基性線維芽細胞増殖因子) タンパクを用いた下肢の血管新生です。下肢虚血の重症度と生存率ですが、同年代の下肢虚血の無い方では15年生存率が約80%ほどです。一方間欠性跛行のある方の生命予後は15年で20%くらいまで下がります。

さらに重症の下肢虚血グループでは10年を超えて生存する方があまりありません。間欠性跛行は、重症下肢虚血のgradeで無症状の次の軽いグループです。そのような症例でも生存率がここまで落ちます。それ以上の重症下肢虚血は安静時疼痛、潰瘍、壊疽等があり、10年以上生存する方はなく、我々の研究は重症下肢虚血の中で最重症

の壊疽になった人は除く、つまり安静時疼痛および潰瘍のある方が対象です。

2. 血管新生療法への期待と課題の解決

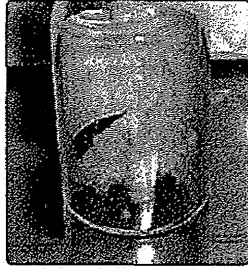
こうした人たちは従来の治療法は受けていても悲惨な生命予後で、新しい治療法が求められており、現在注目されているのが血管新生療法です。血管新生療法にはタンパク治療、遺伝子治療、細胞移植治療等があります。それぞれ問題点があり (Table 1)、タンパク治療の最大の課題はタンパクの半減期が非常に短いことで、治療局所に十分に投与するには大量に持続的に投与する必要があり、副作用の危険が増大する懸念があるということです。

このようなタンパク治療を可能にしたのは、生

Table 1 血管新生療法の課題

タンパク治療	遺伝子治療	細胞移植治療
<ul style="list-style-type: none"> • きわめて短い半減期 → DDSが必要 • 全身・反復・大量投与による副作用 <ul style="list-style-type: none"> • 腫瘍増殖 • 網膜増殖 • 動脈硬化促進 	<ul style="list-style-type: none"> • 遺伝子発現の調整困難 • 免疫・炎症反応 • 長期的な安全性不明 	<ul style="list-style-type: none"> • 細胞種の適否 • 細胞の確保 (全身麻酔・G-CSF) • 免疫反応 • 複雑な手技 • 高コスト

Fig. 1 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルによるDDS

<p>安全性</p> <ul style="list-style-type: none"> • 生体吸収性材料 → 遺伝材料に対する優位性 • 局所・少量徐放が可能 → 全身副作用の回避 <p>DDSにおける応用性</p> <ul style="list-style-type: none"> • 徐放期間を自由にコントロール • 様々な薬に応用 (低分子ペプチド・タンパク質) • あらゆる形に成型可能 (粒子・シート・ディスク) <p>臨床への実現可能性</p> <ul style="list-style-type: none"> • 遺伝子治療・細胞移植治療に比べて手技が簡便で低コスト • タンパク (bFGF) は医薬品, ゼラチンハイドロゲルは医療材料 → 臨床応用へのハードルがかなり克服されている。 	 <p>ゼラチンハイドロゲル粒子</p>
--	--

生体吸収性ゼラチンハイドロゲルによる drug delivery system (DDS) の開発で、橋渡し研究支援推進プログラムのシーズとしては、コラーゲン由来物質等による新規DDSを用いた治療法の開発、プロジェクト責任者は田畑泰彦先生 (京都大学再生医科学研究所教授) です。

このDDSですが (Fig. 1)、生体吸収性材料なので、改めて取り出す必要もなければ体内にずっと残ることもありません。治療局所において少量を徐々に放出できる可能性があり、これにより全身大量投与が回避できます。徐放期間を数日から1カ月ぐらいのスパンで自由にコントロール可能です。またbFGF以外の低分子ペプチドやタンパク質等、様々な薬に応用できます。今回は細粒という形ですが、他にシート状、ディスク状にもできます。

実現可能性は、遺伝子治療や細胞移植治療に比べて手技が簡単でコストが低いことです。またゼラチンは医療材料として既に幅広く使用されており、bFGFは既に医薬品として承認されていることも臨床応用に有利です。

3. 先行臨床試験成績と投与方法

先行臨床試験は、下肢切断の可能性が高い重症下肢虚血患者を対象に、腰椎麻酔下で虚血下肢に40カ所筋肉内投与、観察期間24週でした。注射器で虚血のある下肢に筋注します。

血管新生効果をレーザードップラー血流計で見ると (Fig. 2)、試験後4週、24週と非常に血流が改善しています。7例中4例に潰瘍がありましたが、4週、12週と治癒しています。

薬事承認・保険診療に向けて、本プログラムの支援を受けて、治験薬GMP準拠の治験薬製造設備を薬剤部に設立できました。さらに人材確保と育成もスタートし、2009年8月に「血管新生・組織再生プロジェクト」として京都大学医学部附属病院からの支援も得られることになり、高度医療評価制度を承認取得する方向となりました。

ゼラチンハイドロゲルの製造から患者への投与までの流れですが、無菌特殊製剤室でゼラチンハイドロゲルを調整して粉碎します。それを均一化した細粒にしてバイアルに充てんするまでの作業が治験薬GMP施設で行われ、冷蔵庫で保管します。使用時はbFGFを溶解した生理食塩水をバイアルに注入し、ゼラチンハイドロゲルを膨潤させて再び注射器に吸いとり、40カ所にマークをつけて筋注します。

4. 先進医療から治験へ

先進医療については、事前相談を計3回実施し最終が2010年3月4日、高度医療評価会議で同26日に高度医療として承認されました。続いて先進医療専門家会議で同年6月18日第3項先進医療として承認されました。プロトコルは (Table 2)、

Fig. 2 先行試験での著明な血管新生効果

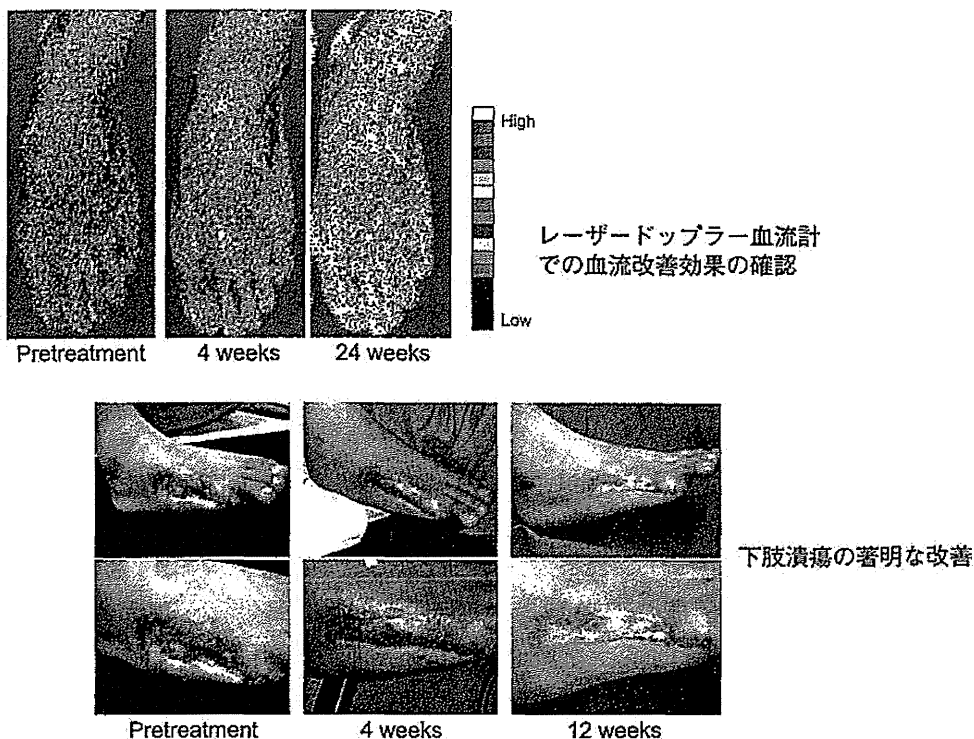


Table 2 第三項先進医療の概要

【目的】	bFGF徐放化ゼラチンハイドロゲルによる血管新生療法により重症虚血下肢患者を救済すること
【対象】	閉塞性動脈硬化症・パーチェー病による重症下肢虚血患者10名
【製剤】	<ul style="list-style-type: none"> • bFGF (トラフェルミン：科研製薬より購入) • ゼラチンハイドロゲル (治験薬GMP準拠にて作製)
【エンドポイント】	主要エンドポイント：安全性およびTcO ₂ 副次エンドポイント：潰瘍、疼痛、歩行距離、ABI、TPI
【試験期間】	2010年9月～2013年12月

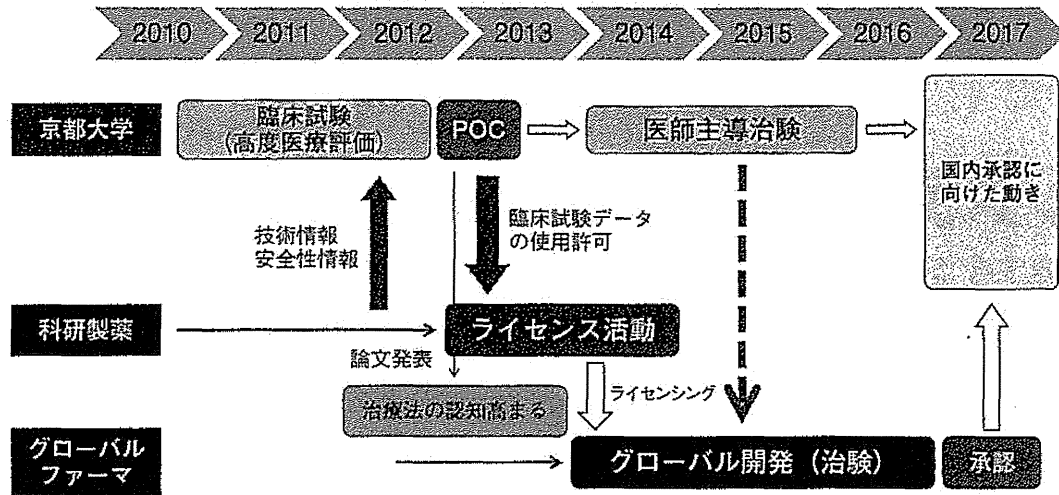
症例数10例でゼラチンハイドロゲル製造はGMPで行い、主要エンドポイントは安全性および経皮的な酸素分圧、副次エンドポイントは疼痛の改善、歩行距離がどれくらい伸びたか、潰瘍のある方ではどれほど縮小したかも評価します。

試験期間は2010年9月にスタート、2013年12月終了を予定しています。2012年2月末に10例目の登録が終わり目標達成となりました。うち6例が治療後24週の観察期間を終了しました。

治療に関すると考えられる重篤な有害事象は、現時点では認めていません。半年の経過観察が必要なので、データ固定・統計解析は2012年の秋口になると思われます。予定よりも1年ほど早く終わると期待しています。

治験に向けてですが、企業による治験薬製造を準備中で、医師主導型治験ないし国際共同治験等の可能性を模索しています (Fig. 3)。

Fig. 3 bFGFゼラチンハイドロゲル開発ロードマップ



* * *

生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用いた 血管新生療法

Therapeutic angiogenesis using biodegradable gelatin hydrogel

丸井 晃 坂田隆造

Key words : 血管新生療法, 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF), ゼラチンハイドロゲル,
虚血性心疾患, 重症下肢虚血

はじめに

虚血性心疾患や重症下肢虚血に対する血管新生療法が近年脚光を浴びており、既に国内外で遺伝子導入や細胞移植による血管新生療法が行われている。しかし現時点ではプラセボ群を置いたランダム化比較試験での有効性が証明されておらず、いまだに治療法として確立していない。また、これらの方法によって形成される新生血管の成熟度や永続性、虚血部で活性化すべき血管新生タンパクの組み合わせなどについては不明な点が多く残されている。更に臨床への応用に当たっては、臨床効果の客観的な評価法や承認に至るまでの医療制度への対策、従来の薬物療法やカテーテル治療・外科手術との位置づけなど、多くの課題が残されている。著者らは遺伝子導入や細胞移植とは別のアプローチとして生体吸収性材料のゼラチンを用いた細胞増殖因子のドラッグデリバリーシステム(DDS)を血管新生療法に応用しており、本稿ではその心臓血管外科領域における試みを紹介する。

1 様々な血管新生療法

現在臨床では主として細胞増殖因子タンパク・遺伝子導入・細胞移植による血管新生療法

が行われている。タンパク治療は組織再生を促す増殖因子タンパクを投与し、遺伝子治療は増殖因子タンパクをコードした遺伝子をウイルスベクターもしくはプラスミドDNAなどにより投与する。細胞移植治療は、骨髓幹細胞・間葉系幹細胞などを移植することによって血管新生を促す。

しかしタンパク治療では通常高濃度の増殖因子の反復投与を必要とする点、遺伝子治療ではウイルスやプラスミドなどの遺伝材料の短期・長期的な安全性が懸念される点、増殖因子の徐放コントロール性を十分にもったベクターがいまだ存在しない点、目的臓器以外での遺伝情報の発現などの問題点も指摘されている¹⁾。細胞移植治療においても自己骨髓幹細胞移植では細胞採取時に全身麻酔を必要とし、細胞種の適否、免疫反応、十分な細胞数の確保などの問題もいまだ解決されていない。また細胞の採取・培養・管理などにかかるコストは細胞移植治療の課題となっている。

2 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルによる DDS

そこで著者らは新たなアプローチとして生体吸収性材料のゼラチンから作製した「ゼラチン

Akira Marui, Ryuzo Sakata: Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine
京都大学大学院医学研究科 心臓血管外科

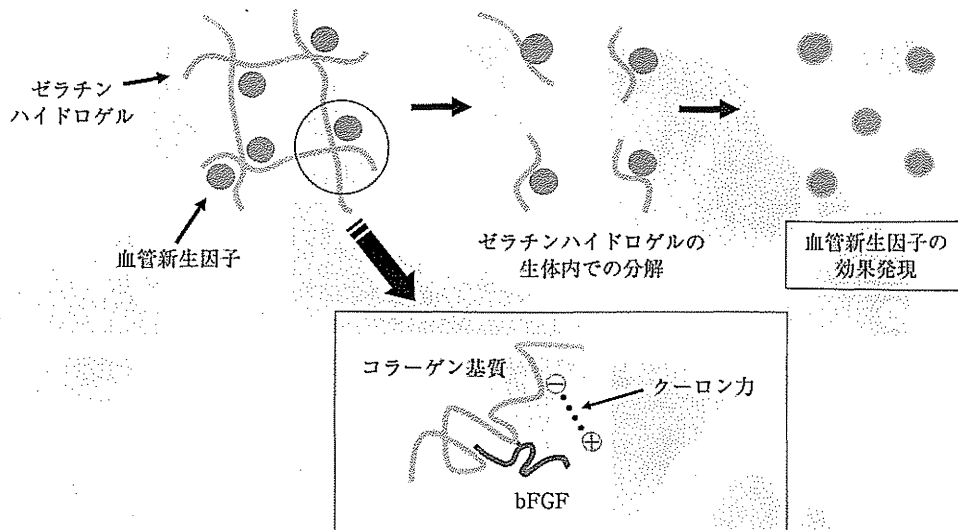


図1 ゼラチンハイドロゲルの徐放機序

ゼラチンハイドロゲルは生理活性を保ったまま血管新生因子を静電気力により吸着している。これを生体内に投与するとゼラチンハイドロゲルが生体内で分解されるに従い血管新生因子の効果が発現する。

ハイドロゲル'をDDSに応用した²⁾。ゼラチンハイドロゲルは酸性ゼラチンを化学架橋して作製する。ゼラチンハイドロゲルは生理活性を保ったまま血管新生因子などのサイトカインを静電気力により吸着し、これを生体内に投与するとゼラチンハイドロゲルが生体内で分解されるに従いサイトカインの効果が発現する(図1)。

この方法の最大の利点はゼラチンハイドロゲルの生体吸収性であり、臨床における安全性が期待できる点である。ゼラチンは既に臨床応用されている材料であり、生体内で分解された後、生体に毒性のないアミノ酸になる。またゼラチンハイドロゲルは、タンパクの発現の時期、濃度をきめ細かくコントロールでき、シート状・ディスク状・粒子状などの成形が可能で応用箇所の幅が広く、様々なタンパクを組み合わせた徐放投与が可能である(DDSにおける幅広い応用性)。更に、細胞移植・遺伝子治療と比べて患者投与までの手技が非常に簡便で低コストであり、実施可能性という点でも臨床向きといえる。

3 心臓血管外科領域におけるゼラチンハイドロゲルの応用

1) 基礎研究

著者らは、ゼラチンハイドロゲルから優れた血管新生・組織再生因子である塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)などを徐放させることにより、様々な動物実験で有効性を証明してきた。bFGFはFGFファミリーに属する人体に広く分布する強力な血管新生・組織再生因子であり、血管新生(angiogenesis)のみならず動脈形成(arteriogenesis)(小動脈レベルの血管拡張、リモデリング)を促進する特色をもつ。更にbFGFは血管内皮増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)などの増殖因子をupregulateする特徴をもっている。例をあげると、虚血性心疾患における血管新生・心機能回復^{3,4)}、細胞移植治療前の血管新生誘導⁵⁾、胸骨感染後の骨再生促進⁶⁾、重症下肢虚血に対する血管新生⁷⁻¹⁰⁾、肺高血圧症治療¹¹⁾、人工臓器感染予防¹²⁾など、非常に多くの領域での有効性を確認してきた。

VII

血管炎の血管新生療法と免疫療法