

Fig. 3 Pharmacokinetic parameters of (a) H12-(ADP)vesicles and (b) (ADP)vesicles at a dose of 10, 20, and 40 mg/kg (N=5).

2. H12-(ADP)小胞体の臓器分布

RI 標識 H12-(ADP)小胞体を 40 mg/kg にて投与し 24 時間後の各臓器の集積率を比較したところ、 ^3H 、 ^{14}C とも顕著に脾臓へ集積し、次いで肝臓に集積した(Fig. 4 (a))。これら臓器は細網内皮系(マクロファージ)が多い臓器であり、 ^{99}Tm 標識した小胞体で得られた結果³⁾と類似した臓器分布であることを確認した。また、(ADP)小胞体投与群もほぼ同様の結果が得られ、H12 結合による臓器分布の差異はないことを明らかにした(Fig. 4 (b))。他方、ADP 水溶液(1 mM)投与群では、 ^{14}C は速やかに尿中に排泄されることも確認できた。

さらに興味深いことに、脾臓では ^{14}C が ^3H より多く集積し、肝臓では逆であった(^3H が ^{14}C より多く集積)。この集積性の相違を明らかにするために、経時的(0.5-24 時間後)に両者の集積率を測定したところ、投与 30

分後では、脾臓と肝臓とも ^3H と ^{14}C の集積率にほとんど差異はなく、小胞体に ADP が内包された状態で脾臓および肝臓に取り込まれていることが明らかになった(Fig. 5, Fig. 6)。ところが脾臓において、投与 3 時間以降では徐々に両者の乖離が見られ、 ^{14}C が ^3H よりも高値を示した。他方、肝臓では ^3H が ^{14}C よりも高値を示した。

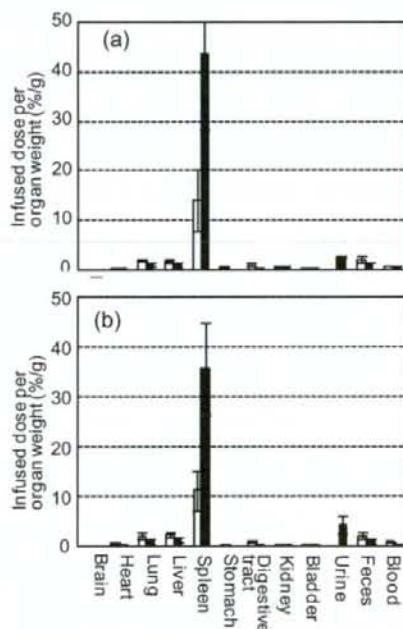


Fig. 4 Bio-distribution of (a) H12-(ADP)vesicles and (b) (ADP)vesicles at a dose of 40 mg/kg as percentage of the infused dose per gram of organ at 24 hr after administration into rat (N=5). □: ^3H (Cholesterol), ■: ^{14}C (ADP).

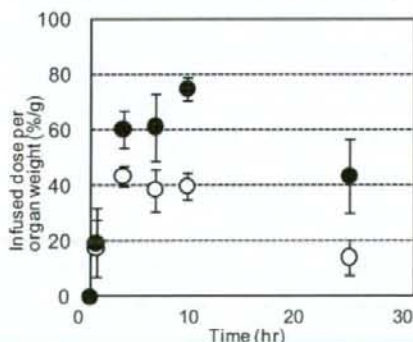


Fig. 5 Accumulation of H12-(ADP)vesicles to spleen at a dose of 40 mg/kg as percentage of the infused dose per gram of organ after administration into rat (N=5). ○: ^3H (Cholesterol), ●: ^{14}C (ADP).

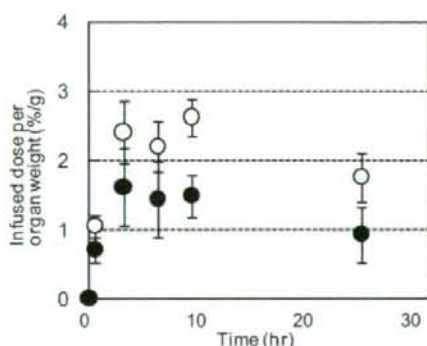


Fig. 6 Accumulation of H12-(ADP)vesicles to liver at a dose of 40 mg/kg as percentage of the infused dose per gram of organ after administration into rat (N=5). ○: ³H (Cholesterol), ●: ¹⁴C (ADP).

脂質成分(コレステロールエステルまたはトリグリセリドに変換された状態)は、血液中のリポ蛋白によって肝臓に輸送されることが知られている。H12-(ADP)小胞体の³Hと¹⁴Cの血中濃度推移における乖離現象は、脾臓に集積したH12-(ADP)小胞体のコレステロール成分がリポ蛋白代謝のメカニズム(リポ蛋白として血中を再循環し、肝臓に取り込まれ胆汁酸や遊離コレステロールという形で胆汁中へ排出される)に従って代謝されたためと説明できる。

他方、ADP成分はコレステロールに比べてその代謝に至るまでの時間を要したため、最も集積率の高い脾臓においては¹⁴Cが³Hよりも高値を示したと考えられる。具体的には、ADPは腎臓、筋肉などでイノシンやヒポキサンチンにまで分解され、その後、肝臓で尿酸になり体外へ排出される。ラットは強い尿濃縮能をもつため、本実験におけるADPの排出形態はアラントインと考えられる。最終的に、³H(コレステロール→胆汁酸)は糞として排泄され、¹⁴C(ADP→アラントイン)は尿中に排泄されることも明らかにした(Fig. 7, 8)。

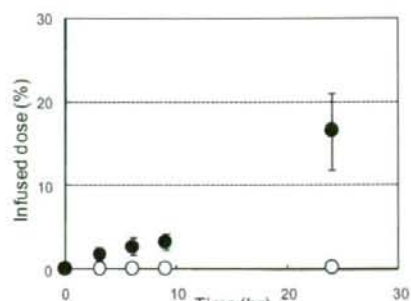


Fig. 7 Elimination of H12-(ADP)vesicles to urine as percentage of the infused dose after administration into rat (N=5). ○: ³H (Cholesterol), ●: ¹⁴C (ADP).

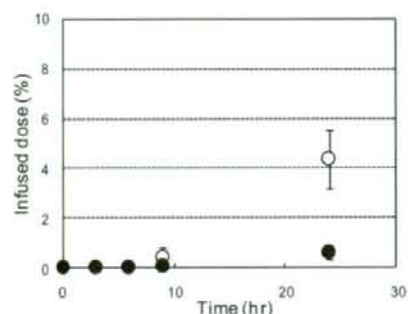


Fig. 8 Elimination of H12-(ADP)vesicles to feces as percentage of the infused dose after administration into rat (N=5). ○: ³H (Cholesterol), ●: ¹⁴C (ADP).

3) Sou, K. *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 702-709 (2005).

D. 結論

- 1) 投与6時間までは内水相のADPとほぼ同様の2相性の血中濃度推移を示し、その後両者の乖離が徐々に見られた($T_{a1/2}$: ³H: 1.8 hr, ¹⁴C: 2.2 hr, $T_{B1/2}$: ³H: 30.1 hr, ¹⁴C: 12.4 hr)。その挙動はH12の有無に関わらず血中濃度推移は同等であった。
- 2) H12-(ADP)小胞体は主に脾臓に集積した。また、H12の有無に関わらず集積性の相違は認められなかった。
- 3) 得られた薬物動態パラメータから、止血効果を発現する投与量(40 mg/kg)で

H12-(ADP)小胞体を投与しても、脾臓、肝臓を中心とする細網内皮系は飽和に達していないと判断された。

4) H12-(ADP)小胞体の ADP 成分は尿、コレステロール成分は肝臓を介して糞として排泄された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

(1) Okamura, Y., Fujie, T., Nogawa, M., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits. *Transf. Med.* **18**, 158-166 (2008).

(2) 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫. 「人工血小板の開発」 *Medical Science Digest* **34** (4), 138-140 (2008).

(3) 半田 誠, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫. 「特集: 血小板をつくろう -血小板代替物-」 *日本血栓止血学会誌* **19** (6), 774-778 (2008).

(4) Okamura, Y., Takeoka, S., Eto, K., Maekawa, I., Fujie, T., Maruyama, H., Ikeda, Y., and Handa, M. Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 470-477 (2009).

(5) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Specific accumulation of iopamidol-encapsulated phospholipid vesicles carrying fibrinogen

γ -chain dodecapeptide to vascular injury using computed tomography. *Nanomedicine* (2009) *submitted*.

(6) Okamura, Y., Fukui, Y., Suzuki, H., Kabata, K., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Disk-shaped biodegradable nanosheets carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide and their enhanced effects of platelet aggregation as a novel platelet substitute. *Bioconjugate Chem.* (2009) *to be submitted*.

(7) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Controlled Release of adenosine diphosphate encapsulated liposomes carrying fibrinogen γ -chain peptide in platelet aggregation- dependent manner. *J. Controlled Release* (2009) *to be submitted*.

(8) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Biodistribution of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-coated, adenosine diphosphate- encapsulated liposomes. *Nanomedicine* (2009) *to be submitted*.

2. 学会発表

(1) Okamura, Y., Takeoka, S., Maekawa, I., Eto, K., Ikeda, Y., and Handa, M. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide on the surface and adenosine 5'-diphosphate inside as a platelet substitute. The 13th Meeting on Thrombosis and Rheology at Tokyo, Japan (2008.3.).

(2) Okamura, Y., Eto, K., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Development of liposome-based platelet substitutes having an excellent hemostatic ability amplified by releasing adenosine 5'-diphosphate in the platelet aggregates. 11th Liposome Research Days

Conference at Yokohama, Japan (2008.7.).

なし

(3) Handa, M., Okamura, Y., Takeoka, S., and Ikeda, Y. Fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-incorporated liposomes as a synthetic platelet substitute. American Association of Blood Banks annual meeting & Txpo. at Montreal, Canada (2008.10.).

(4) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合 ADP 内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 88 回日本化学会春季年会 (2008.3., 東京).

(5) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ADP内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第57回高分子学会年次大会 (2008.5., 横浜).

(6) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 池田 康夫, 半田 誠, 武岡 真司. 「血小板凝集をトリガーとしてADPを放出するリボソームの血小板代替物としての止血能評価」第14回日本血液代替物学会 (2008.10., 東京).

(7) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「止血能を増幅する人工血小板: 血小板凝集をトリガーとしてADPを放出するリボソームの止血能評価」第31回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11., 大阪).

(8) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「ドデカペプチド結合リボソームの血管損傷部位に対する特異的集積性評価」第31回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11., 大阪).

G. 知的財産権の出願・登録状況

平成 20 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業: 政策創薬総合研究事業)
分担研究報告書

H12-(ADP)小胞体の膜物性と ADP 放出特性の相関

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
研究協力者 岡村 陽介 (早稲田大学 理工学術院 理工学研究所, ヒューマン
イェンス振興財団研究員)
江藤 薫子 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
勝野 峻介 (早稲田大学 先進理工学部)
丸山 仁美 (慶應義塾大学 医学部 血液内科, 研究員)

【研究要旨】

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させたリン脂質小胞体は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集形成を促進させながら内包物質(モデルとして水溶性蛍光物質(カルボキシフルオロセイン)を利用)を放出し、特に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させれば(H12-(ADP)小胞体)、その止血能は顕著に向上することを *in vivo* にて証明してきた。しかし、血小板の濃染顆粒に存在する ADP も血小板凝集に伴って放出されるため、小胞体に内包した ADP との区別が困難であり、その放出が証明できないのが現状であった。

平成 20 年度は、放射性同位元素(RI, [8-¹⁴C]ADP, [1,2-³H]cholesterol)で 2 重標識した H12-(ADP)小胞体を調製し、血小板凝集に伴う ADP 放出を実証すると共に、小胞体の膜物性(膜流動性と被覆層数)と ADP 放出特性との相関を明らかにすることを目的とした。まず、H12-(ADP)小胞体を RI 標識化することによって、血小板凝集をトリガーとして内包した ADP が放出される機構を初めて実証することに成功した。その放出には、小胞体の膜流動性と被覆層数が関与すること、即ち、膜流動性が高く被覆層数が少ない小胞体ほど ADP 放出能が向上することを明らかにした。さらに、保存時における ADP 内包安定性が高く、且つ血小板凝集塊中で内包 ADP を放出する機構を持つ小胞体(平成 18 年度に確立した H12-(ADP)小胞体(DPPC 系))を投与すれば、止血能を向上できることを *in vivo* にて実証できた。

A. 研究目的

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させたリン脂質小胞体は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集形成

を促進させながら内包物質(モデルとして水溶性蛍光物質(カルボキシフルオロセイン)を利用)を放出し、特に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包さ

せれば(H12-(ADP)小胞体)、その止血能は顕著に向上することを *in vivo* にて証明してきた¹⁾²⁾。しかし、血小板の濃染顆粒に存在する ADP も血小板凝集に伴って放出されるため、小胞体に内包した ADP との区別が困難であり、その放出が証明できないのが現状であった。

平成 20 年度は、放射性同位元素(RI, [8-¹⁴C]ADP, [1,2-³H]cholesterol)で 2 重標識した H12-(ADP)小胞体を調製し、血小板凝集に伴う ADP 放出を実証すると共に、小胞体の膜物性(膜流動性と被覆層数)と ADP 放出特性との相関を明らかにすることを目的とした。

- 1) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).
- 2) 平成 18, 19 年度 政策創薬総合研究事業 研究報告書

B. 研究方法

1. H12 結合 PEG 脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成

1.1. Glu2C18 の合成

グルタミン酸 (2.96 g, 20 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物 (4.56 g, 24 mmol)をベンゼン 150 mL に溶解させ、Dean-Stark 装置を用いて沸点還流させた (105°C, 1 hr)。この系にステアリルアルコール (11.9 mg, 44 mmol) を添加して沸点還流させた (105°C, 14 hr)。溶媒を減圧除去後、残分をクロロホルム 150 mL に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 150 mL で 2 回、水 150 mL で 2 回分液洗浄した。クロロホルム層を回収し、硫酸ナトリウムにて脱水後、溶媒を減圧除去した。メタノール再結晶、濾過後、乾燥させて白色粉末 Glu2C18 (13.3 g, 収率 85%)を得た。

1.2. マレイミド基導入 PEG 結合 Glu2C18 (MALPEG-Glu2C18)の合成

クロロホルム 10 mL 中に Glu2C18 (575.5 mg, 880 μmol)、TEA (122.5 μL, 880 μmol)を添加後、MALPEG-NHS (Mw:3400, 1.5 g, 279 μmol)を溶解、攪拌した (r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製した後、ベンゼン中に溶解し凍結乾燥後、白色粉末 MALPEG-Glu2C18 (1448.1 mg, 収率 70%)を得た。

1.3. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18)の合成

MAL-PEG-Glu2C18 (1000 mg, 253.7 μmol)と C 末端にシステインを結合させた H12 (328 mg, 253.7 μmol)を DMF10 mL に溶解、攪拌した(r.t., 72 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製後、メタノールにて抽出し、シリカゲルカラムにて精製した (展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水=65/25/4, v/v/v)。真空乾燥後、ベンゼンに溶解させて凍結乾燥し、淡黄色粉末 H12-PEG-Glu2C18 (427.6 mg, 収率 32 %)を得た。

2. H12-(ADP)小胞体の調製法

各混合脂質(**Table 1**)を ADP 水溶液 (1 mM, PBS(pH 7.4))中で水和後(3 hr, r.t.)、エクストルージョン法にて粒径制御し((**a**): 4°C、(**a'**),(**b**)-(d): r.t.、(**b'**): 60°C)、遠心分離にて精製した(100,000g, 30 min, 4°C)。さらに、小胞体分散液をゲルろ過(Sephadex G25)し、外水相に残存する ADP を完全に除去して H12-(ADP)小胞体を調製した。なお、平成 18 年度に確立した H12-(ADP)小胞体は(**b**)である。

Table 1 lipid components of H12-(ADP)vesicles

components	vesicles			
	(a)	(b)	(c)	(d)
DMPC ¹⁾	5	-	-	-
DPPC ²⁾	-	5	-	5
DSPC ³⁾	-	-	5	-
Cholesterol	5	5	5	5
DHSG	1	1	1	1
PEG-DSPE	0.03	0.03	0.03	0.03
H12-PEG-Glu2C18	0.03	0.03	0.03	0.03
ADP (mM)	1	1	1	-

Transition temperature (T_m): 1) 23 °C, 2) 41 °C, 3) 55 °C

3. RI 標識 H12-(ADP)小胞体の調製法

各混合脂質(**Table 1**)を[8-¹⁴C]ADP (1.9 mM, 0.25 mL; 1.85 MBq)を含む ADP 水溶液 (1 mM, 2.25 mL)にて水和後(3 hr, r.t.)、エクストルージョン法にて粒径制御し((a) 4°C、(a'), (b), (c) r.t., (b') 60°C)、遠心分離にて精製した(100,000g, 30 min, 4°C)。次いで、[1,2-³H]cholesterol (20 μM, 25 μL; 1.85MBq in ethanol)を各小胞体分散液に添加・振とう後(10min, r.t.)、ゲル濾過精製を経て(Sephadex G-25)、RI 標識体を得た。

4. H12-(ADP)小胞体の被覆層数の算出

各種 H12-(ADP)小胞体 (f.c. [lipid]=9 mg/mL)に PEG 水溶液 (M_w=100 kDa)を添加 (f.c. 10 mg/mL)、Voltex にて攪拌後、ヘマトクリット管に封入し、遠心分離(12,000 rpm, 30 min, r.t.)させた。沈降した小胞体の体積分率(リボクリット: Lc)を測定し、以下の計算式に従って被覆層数(N)を算出した。

$$\text{Lamellarity: } N = \frac{P \times C \times V \times 10^{-3}}{2S \times Lc \times 10^{-8}}$$

C: 小胞体濃度 (M)
Lc: リボクリット (%)
S: 小胞体1粒子の体積 (m³)
V: 小胞体1粒子の表面積 (m²)
P: 分子占有面積 (m²)

5. H12-(ADP)小胞体の活性化血小板との特異的結合能評価

全血 (1/10 (v/v) 3.8%クエン酸ナトリウム)を遠心分離して(100g, 15 min, r.t.)、多血小板血漿(PRP)を得た。PRP に ACD 溶液 (15% (v/v))と prostaglandin E₁ (PGE₁, f.c. 1 μM)を添加後、遠心分離し(2200g, 7 min, r.t.)、上清を除去した。RCD 溶液(pH 6.5, 含 1 μM PGE₁)に再分散させ、同操作を再度行なった後、Hepes-Tyrode 緩衝液 (pH 7.4)中で再分散して洗浄血小板分散液を調製した。

洗浄血小板 ([PLT] = 2.0 × 10⁵/μL, 25 μL) に DiOC₁₈ 標識した H12-(ADP)小胞体(a)-(c) (f.c.[lipid] = 1.5 mg/mL)を混合し、TRAP-6 (f.c. 50 μM)にて血小板を活性化させ、振とう(10 min, r.t.)、ホルムアルデヒド(f.c. 1.5%)で固定した。フローサイトメーターを用いて血小板の蛍光陽性率を測定した。同様に、H12 未結合体存在下でも試験した。

6. 血小板凝集計を用いた H12-(ADP)小胞体の血小板凝集促進能評価

PRP ([PLT]=2.0 × 10⁵/μL) に 各種 H12-(ADP)小胞体 (f.c. ca. 1 × 10⁹ particles) を添加、攪拌後、ADP (f.c. 3 μM)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて分散液の透過率を連続的に測定した。

他方、血小板凝集塊中における H12-(ADP)小胞体の分布あるいは H12-(ADP)小胞体自体の形態を観察するために、以下の常法に従って試料作成し、透過型電子顕微鏡にて形態的観察した(分担研究者: 鈴木英紀博士)。血小板凝集測定終了後、グルタルアルデヒド(f.c. 0.1% (v/v))にて固定した(30 min, 4°C)。遠心分離にて回収した血小板ペレットを PBS で洗浄し、シヨ糖水溶液中(1 M)に1時間、さらにシヨ糖水溶液中(2.3 M)に終夜浸漬した。この試料

を凍結用試料ビンに載せて液体窒素で凍結後、ミクロトームを用いて凍結超薄切片を作製した。切片を0.5% (w/v)BSAを含むPBSでブロッキングした後、ウサギ由来抗ヒトH12抗体に浸漬、次いで直径10 nmの金コロイド標識ヤギ由来抗ウサギIgGに浸漬させた。酢酸ウランで染色し、透過型電顕で観察した。

7. RI 標識 H12-(ADP)小胞体を用いた ADP 放出率の測定法

6.と同条件(37°C)にて血小板凝集試験を行った。5分間攪拌後、ホルムアルデヒド(f.c. 1.5%)で固定、遠心分離(10,000 rpm, 5 min, 4°C)にて血小板凝集塊を回収した。Solvable[®] (2 mL, PerkinElmer 製)にて可溶化後、Hionic Fluor[®] (15 mL, PerkinElmer 製)を添加し液体シンチレーションカウンター (LSC)にて測定した。[1] 血小板凝集塊への取り込み率、[2] 内包 ADP 放出率は以下の計算式に従った。

$$[1] \text{ Co-sediment ratio of vesicles into platelet aggregates (\%)} = \frac{B_{3H} - C_{3H}}{A_{3H}} \times 100$$

$$[2] \text{ Release of ADP from vesicles (\%)} = \frac{\frac{A_{14C}}{A_{3H}}(B_{3H} - C_{3H}) - (B_{14C} - C_{14C})}{\frac{A_{14C}}{A_{3H}}(B_{3H} - C_{3H})} \times 100$$

A_{3H}, A_{14C}: PRPに添加した全放射線量
 B_{3H}, B_{14C}: ADP添加後における凝集塊中の放射線量
 C_{3H}, C_{14C}: ADP添加前における血小板ペレット中の放射線量

8. ADP 内包安定性試験

各種 H12-(ADP)小胞体([lipid]=10 mg/mL)を振とう後(4°C, 37°C, 60°C)、ゲル濾過(Sephadex G-25)してラウリルエーテルにて可溶化した。HPLC (TSKGel ODS-100V, 1 mL/min, Ab. 260 nm, リン酸 (pH=7.0)/メタ

ノール = 97/3 (v/v) (TEA 30 mM))にて残存 ADP を定量し、脂質濃度(リン脂質テストワーク)で補正することで ADP 内包率を算出した。

9. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

Wistar系雄性ラット(三協ラボサービス, 8週齢, 230-280 g)にブスルファンポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL)を0, 3日目に尾静脈投与し(全投与量 20 mg/kg)、投与開始から10日目を血小板減少ラット([PLT] = 19.6 ± 2.6 × 10⁴/μL)として提供した。

セボフラン麻酔後、H12-(ADP)小胞体(a)-(c)を尾静脈投与した(4 mL/kg)。また、生理食塩水、ADP 未内包の H12-小胞体(d)を対照群とした。投与5分経過後、尾先端から1cmの部位にクイックヒール[®](ペクトン・ディッキンソン社製)を用いて切傷した(長さ2.5 mm, 深さ1 mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、出血時間を計測した。

C. 研究結果及び考察

1. 膜流動性の異なる H12-(ADP)小胞体の被覆層数と粒径の制御

Table 1 に示すように、小胞体膜の主成分である PC を DMPC、DPPC あるいは DSPC としてその相転移温度の違いを利用して、膜流動性が異なる小胞体を調製することができる(膜流動性 DMPC > DPPC > DSPC の順に低下する)。

各混合脂質(a)-(c)の造粒温度を制御((a): 4°C, (b),(c): r.t.)して H12-(ADP)小胞体を調製した。得られた (a)-(c)の体積分率 (L_c)から被覆層数を算出したところ、それぞれ 1.1 ± 0.1, 1.1 ± 0.2, 1.2 ± 0.2 枚となり、粒径と同様にほぼ同一に制御可能であった(Table 2)。

さらに、造粒温度を上昇させることにより ((a'): r.t., (b') 60°C)、約2枚の被覆層数を有する(a'), (b')を調製することが可能であった。

Table 2 Lamellarities of H12-(ADP)vesicles (a)-(c).

vesicles	Diameter (nm)	Lamellarity (-)
(a)	240 ± 68	1.1 ± 0.1
(b)	285 ± 78	1.1 ± 0.2
(c)	298 ± 107	1.2 ± 0.2
(a')	240 ± 70	1.9 ± 0.5
(b')	287 ± 83	1.8 ± 0.3

さらに、凍結超薄切片した小胞体の透過型電顕像からも被覆層数の制御を支持すると共に、ウサギ由来抗ヒト H12 抗体を用いた金コロイド標識により、H12 が小胞体膜上に均一に導入されていることも確認した (Fig. 1)。

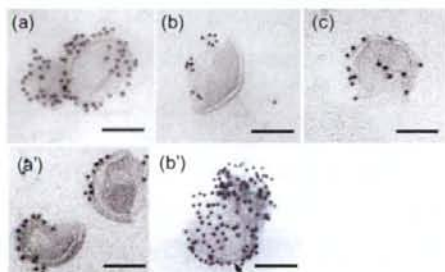


Fig. 1 TEM images of H12-(ADP)vesicles (a)-(c), (a') and (b'). Colloidal golds show H12 conjugated to the surface of the vesicles using anti H12 antibody. Scale bars: 100 nm.

2. H12-(ADP)小胞体の活性化血小板に対する結合能評価

DiOC₁₈ 標識した H12 未結合の(ADP)小胞体を TRAP-6 刺激にて活性化させた血小板に添加し、フローサイトメーターを用いてその結合率を測定したところ、いずれも結合しなかった (Fig. 2)。H12-(ADP)小胞体 (a)-(c)では、活性化血小板に対していずれも特異的に結合し、その結合率はいずれも同程度であった (Fig. 2)。また、(a')や(b')も同

等の結合率を維持した。従って、膜流動性や被覆層数を変化させても活性化血小板に対する結合能は同等であることを明らかにした。

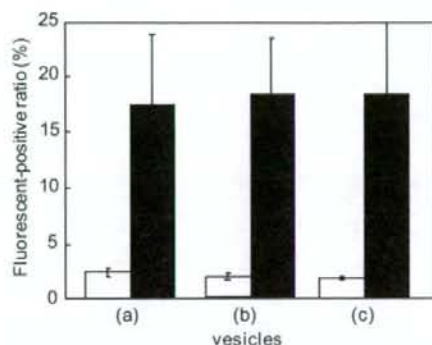


Fig. 2 Binding abilities of H12-(ADP)vesicles (a)-(c) (black column) or (ADP)vesicles (a)-(c) (white column) toward the TRAP-stimulated platelets.

3. H12-(ADP)小胞体の血小板凝集促進能評価

PRP ([PLT] = $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$)に ADP 未内包 H12-小胞体(d) (f.c. ca. 1×10^9 particles)を添加して ADP にて血小板凝集を惹起させたところ、最大透過率は約 35%に留まり、H12-(ADP)小胞体(c)を添加した場合も同程度であった (Fig. 3)。

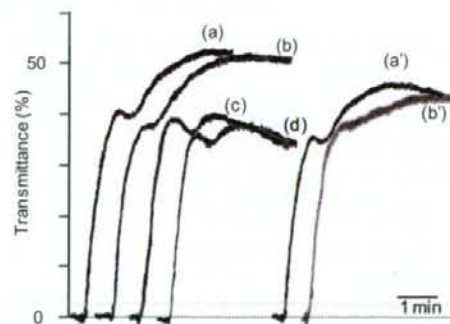


Fig. 3 ADP-induced platelet aggregation in the presence of H12-(ADP)vesicles (a)-(c), (a'), (b'), and H12-vesicles (d).

そこで(a)や(b)を添加したところ、その透

過率は両者とも顕著に増大し、血小板の二次凝集を促進させる効果が認められた(Fig. 3)。他方、(a')と(b')の透過率は、(d)の添加時と比較して増大したものの(a)、(b)のそれには及ばなかった。これは、内包ADPの放出に伴う凝集促進効果の差と考えられ、ADP放出は小胞体の膜流動性と被覆層数に起因する可能性が示唆された。

4. RI 標識 H12-(ADP)小胞体を用いた ADP 放出率測定

RI 標識 H12-(ADP)小胞体を用いて、3と同条件下(37°C)にて血小板凝集試験を行った。遠心分離によって回収した血小板凝集塊を Solvable[®]にて可溶化後、LSCにて測定し、[1] 血小板凝集塊への取り込み率と[2] 内包ADP放出率を算出した。

(c)は血小板凝集塊に $8.3 \pm 1.1\%$ 取り込まれたが、内包ADPは全く放出されなかった(Table 3)。他方、(a)や(b)の血小板凝集塊へ取り込み率は(c)と同程度であったが、ADP放出率は、(a) $58.8 \pm 6.1\%$ 、(b) $49.9 \pm 5.0\%$ と算出され、膜流動性の増大((a) > (b) > (c))と共にADP放出率も増大した(Table 3)。さらに、約2枚の被覆層数を有する(a')、(b')のADP放出率は、(a)や(b)のそれと比較して半分に低下した。

Table 3 Co-sediment ratio of vesicles into platelet aggregates and release of ADP from vesicles.

vesicles	Co-sediment ratio of liposomes into platelet aggregates (%)	ADP release (%)
(a)	9.5 ± 1.2	58.8 ± 6.1
(b)	10.8 ± 2.3	49.9 ± 5.0
(c)	8.3 ± 1.1	<0
(a')	11.3 ± 3.1	24.5 ± 4.2
(b')	13.3 ± 1.0	21.2 ± 6.9

次いで、血小板凝集塊をパラホルムアルデヒド固定化後、凍結超薄切片観察したと

ころ、(a)や(b)の添加時では(c)のそれと比較して明らかに大きな凝集塊を形成しており、活性化血小板間にH12-(ADP)小胞体(金コロイド標識)が存在する所見が得られた(Fig. 4, 分担研究者: 鈴木英紀博士と共同)。従って、H12-(ADP)小胞体はH12を介して血小板と多点結合して血小板凝集間に巻き込まれ(Fig. 4)、その際に受ける物理的な刺激によって内包ADPを放出するが、その放出には小胞体の膜流動性と被覆層数が関与する(即ち、膜流動性が高く被覆層数が少ない小胞体ほど、ADP放出率が增大する)ことを明らかにした。

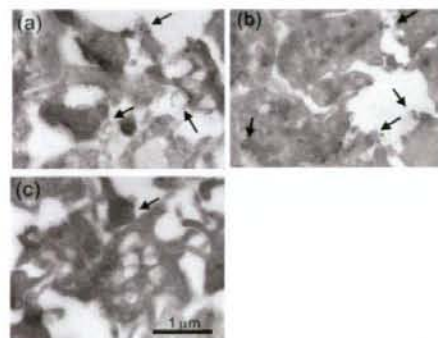


Fig. 4 TEM images of platelet aggregation involving with H12-(ADP)vesicles (a)-(c) after platelet aggregation studies. Colloidal golds (arrows) show H12 conjugated to the surface of the vesicles using anti human H12 antibody.

5. ADP 内包安定性

H12-(ADP)小胞体(b)、(c) ([lipid] = 10 mg/mL)を4°C、37°C、あるいは60°Cで振とうさせたところ、いずれの温度においても少なくとも1週間は安定にADPを内水相に保持していた(Fig. 5 (b), (c))。特に、加速試験下(60°C, 7日間)においても安定に内包されていた(4°Cで7年間の安定性試験に相当)。他方、(a)を4°Cで振とうさせたところ比較的安定に保持されたが、37°CではADPが徐々に漏出し(7日後のADP保持率: $43.4 \pm$

1.0%)、60°Cでは1日後にしてほぼ全量漏出することが明らかとなった(Fig. 5(a))。これは、小胞体の膜流動性に 관련된結果であると考察され、膜流動性を高めてADP放出能を向上すると、保存時のADPの内包安定性が担保できなくなると思われた。

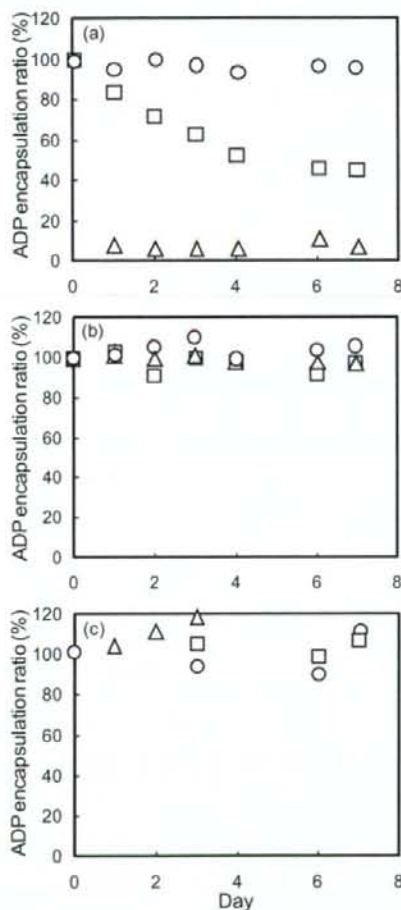


Fig. 5 Stability of ADP encapsulated into the vesicles (a)-(c) at the temperature of 4°C (○), 37°C (□), and 60°C (△).

6. 止血能評価

血小板減少ラット([PLT]=(1.9 ± 0.2) $\times 10^5$ / μ L)に生理食塩水を投与したところ、出血時間は 682 ± 198 秒であり、正常ラット([P

LT]= $8.1 \pm 0.8 \times 10^5$ / μ L)のそれ(178 ± 56 秒)と比較して、約3.8倍延長した(Fig. 6)。ADP未内包H12-小胞体(d)を投与したところ、投与量依存的に出血時間は短縮した(10、40 mg/kgにおける出血時間は、それぞれ 573 ± 127 、 335 ± 96 秒)。H12未結合体では短縮効果が確認できなかったことから、H12-小胞体は止血能を有するナノ粒子であることを確認した(Fig. 6)。

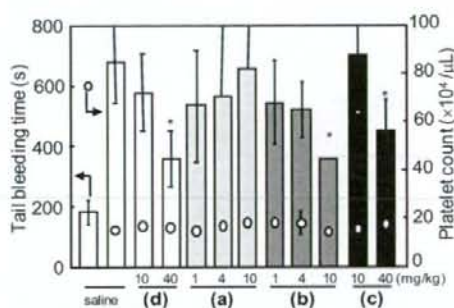


Fig. 6 Hemostatic effects of administration of (a)-(c) H12-(ADP) vesicles and (d) H12-vesicles on rat tail bleeding time. ○, platelet count in rats (n=6-10). *P<0.05 for H12-(ADP) vesicles or H12-vesicles group vs. saline group.

そこで、4.の *in vitro* 試験で最も高いADP放出能を有するH12-(ADP)小胞体(a)を投与したが、止血能の発現には至らなかった(1、4、10 mg/kgにおける出血時間はそれぞれ 540 ± 180 、 565 ± 324 、 656 ± 338 秒)。これは、(a)がADP内包安定性が低いため、血流中でかなりのADPが漏出したためと推測できる(現在、RI標識体を用いて血中濃度推移を測定中)。

次いで、H12-(ADP)小胞体(b)を投与したところ、1、4、10 mg/kgにおける出血時間はそれぞれ 543 ± 134 、 521 ± 88 、 349 ± 49 秒となり、H12-小胞体にて短縮効果の確認できた1/4の投与濃度で同等の短縮効果が得られた。

他方、ADPを放出しないH12-(ADP)小胞

体(c)を投与したところ、ADP 未内包体(d)と同等の出血時間短縮傾向を示し、これはH12による止血効果のみ発現した結果であると考えられる(10、40 mg/kgにおける出血時間は、それぞれ 650 ± 189 、 454 ± 100 秒)(Fig. 6)。

従って、ADPを安定に内包でき、且つ血小板凝集塊中で特異的に内包ADPを放出する機構を持つ小胞体を投与すれば、止血能を向上できることを *in vivo* にて実証した。

D. 結論

(1) H12-(ADP)小胞体を RI 標識することにより、血小板凝集をトリガーとして内包ADPを放出することによって血小板凝集が促進される機構を初めて示すことができた。

(2) 内包ADPの放出には、小胞体の膜流動性と被覆層数が関与する(即ち、膜流動性が高く被覆層数が少ない小胞体ほどADP放出能が向上する)ことを明らかにした。

(3) 保存時のADP内包安定性が高く、且つ血小板凝集塊中で内包ADPが放出されやすい小胞体(平成18年度に確立したH12-(ADP)小胞体(b))を投与すれば、止血能が向上できることを *in vivo* にて実証した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Okamura, Y., Fujie, T., Nogawa, M., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely

thrombocytopenic rabbits. *Transf. Med.* **18**, 158-166 (2008).

(2) Okamura, Y., Utsunomiya, S., Suzuki, H., Niwa, D., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of freestanding nanoparticle-fused sheets and their hetero-modification using sacrificial film. *Colloids and Surf A: Physicochemical and Engineering Aspects* **318**, 184-190 (2008).

(3) 武岡 真司, 岡村 陽介. 「血液の仕組みと人工血液(血液代替物)へのアプローチ」*化学と教育 ~ヘッドライン~* **56** (6), 2-5 (2008).

(4) 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫. 「人工血小板の開発」*Medical Science Digest* **34** (4), 138-140 (2008).

(5) 半田 誠, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫. 「特集: 血小板をつくろう -血小板代替物-」*日本血栓止血学会誌* **19** (6), 774-778 (2008).

(6) Okamura, Y., Takeoka, S., Eto, K., Maekawa, I., Fujie, T., Maruyama, H., Ikeda, Y., and Handa, M. Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 470-477 (2009).

(7) Okamura, Y., Goto, T., Niwa, D., Fukui, Y., Otsuka, M., Motohashi, N., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of free-standing albumin-nanosheets having hetero-surface. *J. Biomed. Mater. Res. A* **89A**, 233-241 (2009).

(8) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Specific accumulation of iopamidol-encapsulated phospholipid vesicles carrying fibrinogen

γ -chain dodecapeptide to vascular injury using computed tomography. *Nanomedicine* (2009) submitted.

(9) Okamura, Y., Fukui, Y., Suzuki, H., Kabata, K., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Disk-shaped biodegradable nanosheets carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide and their enhanced effects of platelet aggregation as a novel platelet substitute. *Bioconjugate Chem.* (2009) to be submitted.

(10) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Controlled Release of adenosine diphosphate encapsulated liposomes carrying fibrinogen γ -chain peptide in platelet aggregation-dependent manner. *J. Controlled Release* (2009) to be submitted.

(11) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Biodistribution of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes. *Nanomedicine* (2009) to be submitted.

2. 学会発表

(1) Okamura, Y., Takeoka, S., Maekawa, I., Eto, K., Ikeda, Y., and Handa, M. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide on the surface and adenosine 5'-diphosphate inside as a platelet substitute. The 13th Meeting on Thrombosis and Rheology at Tokyo, Japan (2008.3.).

(2) Okamura, Y., Eto, K., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Development of liposome-based platelet substitutes having an excellent hemostatic ability amplified by releasing

adenosine 5'-diphosphate in the platelet aggregates. 11th Liposome Research Days Conference at Yokohama, Japan (2008.7.).

(3) Handa, M., Okamura, Y., Takeoka, S., and Ikeda, Y. Fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-incorporated liposomes as a synthetic platelet substitute. American Association of Blood Banks annual meeting & Txpo. at Montreal, Canada (2008.10.).

(4) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合 ADP 内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 88 回日本化学会春季年会 (2008.3., 東京).

(5) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ADP内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第57回高分子学会年次大会 (2008.5., 横浜).

(6) 福井 慶仁, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ポリ乳酸ナノシートによる活性血小板の認識能評価」第57回高分子学会年次大会 (2008.5., 横浜).

(7) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣. 「表裏面の機能が異なるナノシートの構築」第 57回高分子討論会 (2008.9., 大阪).

(8) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 池田 康夫, 半田 誠, 武岡 真司. 「血小板凝集をトリガーとしてADPを放出するリポソームの血小板代替物としての止血能評価」第14回日本血液代替物学会 (2008.10., 東京).

(9) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「止血能を増幅する人工血小板: 血小板凝集をトリガーとしてADPを放出するリポソームの止血能評価」第31

回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11., 大阪).

(10) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「ドデカペプチド結合リポソームの血管損傷部位に対する特異的集積性評価」第31回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11., 大阪).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

臨床応用可能な人工血小板としての H12 結合微粒子の *in vivo* 評価
－人工血小板投与による臓器代謝変動の評価－

分担研究者 梶村 眞弓（慶應義塾大学・医学部・医化学教室・講師）
研究協力者 森川 隆之（慶應義塾大学・医学部・医化学教室・修士課程）
岡村 陽介（早稲田大学・理工学研究所、
ヒューマンサイエンス振興財団研究員）
菱木 貴子（慶應義塾大学・医学部・医化学教室・助教）
川村 友美（慶應義塾大学・医学部・医化学教室・研究員）
江藤 薫子（早稲田大学・理工学研究科・修士課程）
丸山 仁美（慶應義塾大学・医学部・血液内科・研究員）
武岡 真司（早稲田大学・理工学術院・教授）

研究要旨

H12-(ADP)小胞体は、血小板膜上に発現する活性化型 GPIIb/IIIa を特異的に認識する fibrinogen γ 鎖 C 末端のアミノ酸配列 (HHLGAKQAGDV: H12) を担持させたリン脂質小胞体に ADP を内包させた小胞体であり、本班で開発された有力な人工微小血小板粒子である。本粒子は血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる効果に加え、血小板凝集塊の中でのみ、特異的に ADP を放出することによりさらなる止血能を発揮する。これまでの本班の研究により H12-(ADP)小胞体粒子が、血小板減少ラット及びラビットで出血時間を短縮させる効果を有することが確認されている。さらに、投与後の血小板、凝固・線溶系マーカーの変動がないこと、被験動物の急性の死亡例もないことなど安全性の検討もなされてきた。本年度は安全性評価の一端として、H12-(ADP)小胞体粒子単回投与による網内系負荷によって臓器代謝がどのように変動するかを捉えることを目標とした。そのため、まず小胞体投与後のラット肝臓及び脾臓を試料とし、これまでにストレス応答性に発現レベルが調節されることが知られている誘導型酵素である heme oxygenase-1 (HO-1) の発現量を western blot および免疫組織化学を用いて検討した。その結果 H12-(ADP)小胞体粒子投与後 6 時間では、肝臓及び脾臓の HO-1 の発現の上昇が認められた。しかしこの上昇は一過性で 24 時間までにベースラインレベルまで減少した。そこで HO-1 の誘導が最大に達した投与後 6 時間の肝臓のメタボローム解析を施行したところ、糖代謝、ペントースリン酸経路、クエン酸回路の代謝物に変化がある傾向が認められた。

A. 研究目的

本分担研究では、人工血小板の実用化に

必須のプロセスである人工血小板粒子の生体内挙動の評価系を確立するため

詳細な検討を展開してきた。

血小板の膜上に発現する活性化型 GPIIb/IIIa を特異的に認識する fibrinogen γ 鎖 C 末端のアミノ酸配列 (HHLLGGAKQAGDV: H12) を担持させたリン脂質小胞体に ADP を内包させた (H12-(ADP)小胞体)は、血小板止血機能を補助する微小粒子として本研究班で開発された。これまでの研究により、この H12-(ADP)小胞体が、血小板減少ラット及びラビットを用いた実験系で出血時間を短縮させる効果を有することが確認されている。しかしながら、H12-(ADP)小胞体粒子単回投与による網内系負荷によって、ラット肝臓、脾臓などの臓器代謝がどのよう変動するかについては証左が得られていなかった。そこで本年度は生化学的手法及び網羅的代謝解析技術を用いて本粒子投与による臓器代謝の変動を解析した。

B. 研究方法

B-1. 実験動物および H12-(ADP)小胞体の投与

Wistar 系雄性ラット (180-260 g) は日本クレアより購入した。H12-(ADP)小胞体は、早稲田大学武岡真司教授から供与を受けた。Diethyl ether 麻酔後、H12-(ADP)小胞体を尾静脈投与した (40 mg/kg)。また、生理食塩水を陰性対照群とした。投与後、3, 6, 9, 24 時間で再度 diethyl ether 麻酔下、脾臓及び肝臓を採取した。また心臓採血後、全血を遠心分離 (1580G, 4°C, 7min) にて血漿を回収し肝機能マーカーである GOT (グルタミン酸オキシサロ酢酸トランスアミナーゼ) と GPT (グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ) GOT を測定した (SRL 委託)。

B-2. Western blot

ラット肝臓、および脾臓組織から microsomal 画分を調製し、western blot 解析を行った。陽性対照群としては、recombinant HO-1 (Stressgen, Ann Arbor, MI) を使用した。試料 120 μ g と recombinant HO-1 10 μ g を 12% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜に転写した。1 次抗体として、抗ラット HO-1 モノクローナル抗体である GTS-1 (Takara) を使用した。また α -tubulin を loading control とした。PVDF 膜は 0.1% Triton X-100 を含む Tris-buffer (以下 TBST) にスキムミルクを 5% 加えた溶液中で 1 時間インキュベートした後に、0.5 μ g/ml の GTS-1、または 1000 倍希釈した抗 α -tubulin 抗体 (Cell Signaling Technology) を反応させた。これらの抗体は 5% ウシ血清アルブミンを含む TBST で溶解し 4°C で一晚反応させた。1 次抗体を洗浄後、PVDF 膜を 2 次抗体として Horse radish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG₁ 抗体 (GE Healthcare)、または HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (GE Healthcare) で 60 分間、室温にてインキュベートした。蛋白の発現は enhanced chemiluminescence system (GE Healthcare) を用いて検出した。

B-3. 免疫組織化学

ラットから肝臓、脾臓を採取後、Periodate /Lysine/ Paraformaldehyde (PLP) 液で浸漬固定を行った (4°C, 4 時間)。固定後、10%、15%、20% ショ糖溶液で段階的に洗浄を行い、OCT

compound (Miles Laboratories, Elkhart, IN) で包埋した。クライオスタットにて、厚さ 60 μ m の切片を作成した。1 次抗体として、抗ラット HO-1 モノクローナル抗体である GTS-1 を、macrophage を認識する抗体 Ki-M2R (BMA Biomedicals) を使用した。凍結切片は 0.3% TritonX-100 を含む PBS (PBST) に正常ヤギ血清 5% を加えた溶液中で 1 時間インキュベートした後に、GTS-1 を 5 μ g/ml、また KiM2R は 0.4 μ g/ml の濃度で反応させた。これらの抗体は 5% ウシ血清アルブミンを含む PBST で溶解し 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。1 次抗体を洗浄後、切片を 2 次抗体 Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG1 抗体、Alexa Fluor 555 標識抗体ラビット IgG 抗体、及び TO-PRO-3 (Invitrogen, Basle, Switzerland) で 4 時間、室温にてインキュベートした。2 次抗体を洗浄後、4% Paraformaldehyde /PBS で 10 分間再固定した。レーザー共焦点顕微鏡 Radiance2100 MP (BioRad, Hercules, CA) を用いて撮像した。

B-4. メタボローム解析

ラットから肝臓、脾臓を摘出し、液体窒素にて凍結した。内部標準として L-Methionine sulfone (Wako 502-76641) and 2-Morpholinoethane sulfonic acid (MES, Dojindo 349-01623) 各 300 μ M を含んだ methanol 溶液 2 mL に約 300 mg の組織を入れ、超音波破砕器で 2 分間破砕した。十分攪拌した後、水を 500 μ L 加え再攪拌した。300 μ L-aliquot に 200 μ L のクロロホルムを添加し、これを遠心した (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15 min)。上層の水-methanol

層から 200 μ L を限外濾過フィルター (分画分子量 5,000, Amicon Ultrafree MC 5,000, Millipore) に移し、90 分間遠心した (10,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C)。ろ液を遠心濃縮し capillary electrophoresis (CE)-Mass spectrometry (MS) (Agilent) 解析試料とした。

C. 研究結果及び考察

C-1. H12-(ADP) liposome 投与による Heme oxygenase 1 の発現変動

H12-(ADP)-liposome (40 mg/kg) 投与後 3, 6, 9, 24 時間後の肝臓及び脾臓の

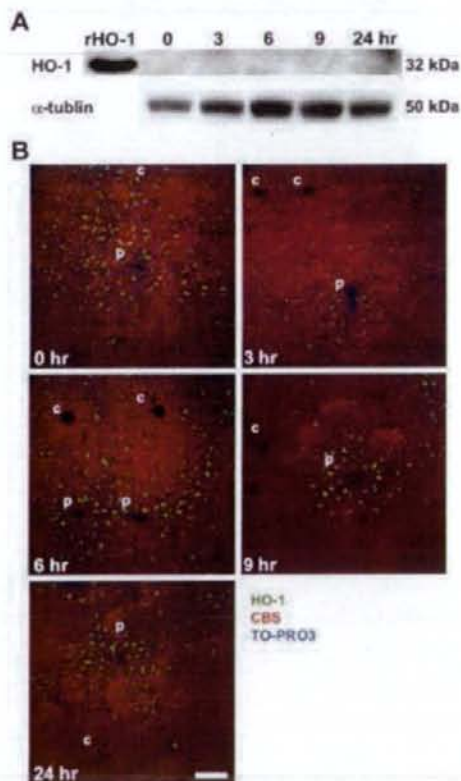


図 1. 肝臓における H12-(ADP)-liposome 投与による HO-1 発現レベルの経時的変化 (A)、Western blot analysis (B) Immunohistochemistry. Scale bar: 100 μ m.

HO-1 の発現レベルを western blot と免

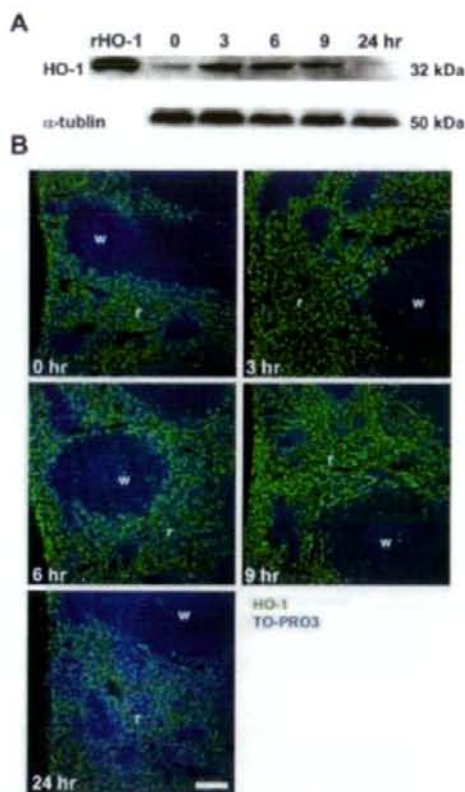


図 2. 脾臓における H12-(ADP)-liposome 投与による HO-1 発現レベルの経時的変化 (A), Western blot analysis (B) Immunohistochemistry. Scale bar: 100

疫組織化学で解析した結果、図 1 に示すように、肝臓では顕著な HO-1 の upregulation は確認できなかった。脾臓においては、投与後 3 時間から HO-1 の発現量は上昇しはじめ、6 時間をピークとして 24 時間後には baseline level まで減少した。脾臓では、red pulp の macrophage に恒常的に HO-1 が発現している。今回の染色の結果では、western blot で認められた、HO-1 の upregulation がどの細胞に特異的に惹起されたものかを検出することはできなかった。しかしながら、この結果をもとに、その後の実験の試料採取条件を 6 時間と 24 時間の 2 ポイントに絞った。

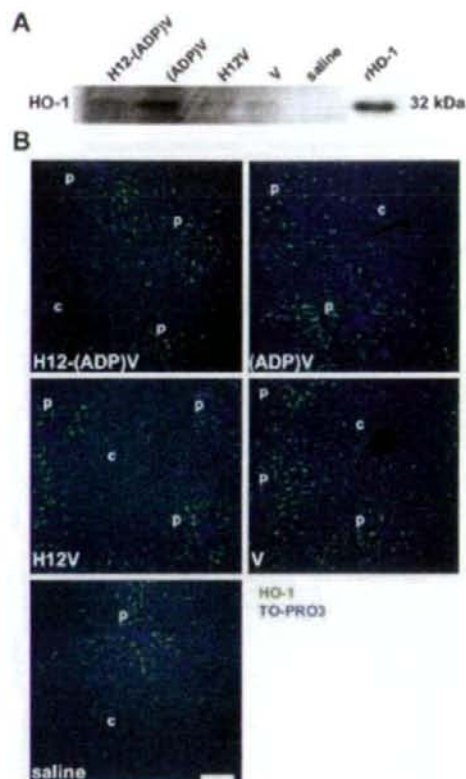


図 3. 肝臓における各 liposome 投与 6 時間後の HO-1 発現 Scale bar: 100 μ m.

次にこれらの HO-1 expression の upregulation が H12、内包された ADP、または liposome 自体のいずれに起因して誘導されたかを確認するため、H12-(ADP) liposome、(ADP) liposome、H12-liposome、liposome 単独および vehicle である saline を投与し、これら 5 群での比較検討を行った。肝臓 6 時間の試料では、saline 以外のすべての群において HO1 の upregulation が認められた(図 3)。また脾臓 6 時間の試料では、saline 投与群においても HO1 が検出された。肝臓脾臓の両組織の macrophage には HO1 が恒常的に発現していることは免疫染色から明らかであるが、western blot では必ずしも検出できな

った (図 4A)。

脾臓での HO1 発現量は western blot densitometry の結果(n=3)、H12-(ADP) liposome、(ADP) liposome、H12-liposome、

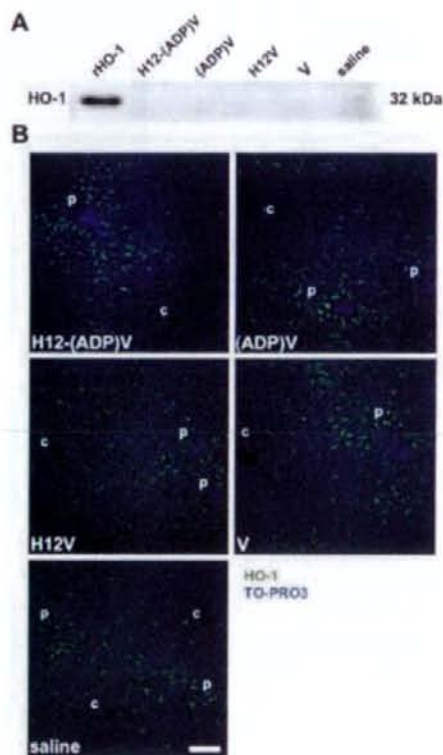


図 4. 肝臓における各 liposome 投与 24 時間後の HO-1 発現 Scale bar: 100 μm。

liposome の 4 群間で統計学的有意差はなかったが、これら 4 群は vehicle 群に比べ有意な発現量の上昇が認められた (図 5)。脾臓 24 時間の試料では、発現量は減少し、群間の差も消失した (図 6)。

C-2. H12-(ADP) liposome 投与による血漿 GOT、GPT の変動

H12-(ADP)小胞体投与後の血漿 GOT と GPT 値は、vehicle 投与群と差が認められなかったことから、40 mg/kg という高濃度の投与でありながらも、肝機能マーカーに変化は及ぼさず、本粒子投与の

安全性の証左となった (図 7)。

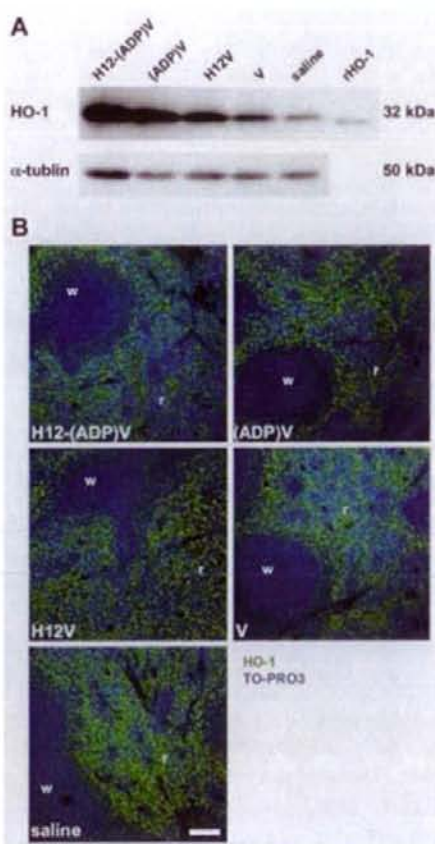


図 5. 脾臓における各 liposome 投与 6 時間後の HO-1 発現 Scale bar: 100 μm。

C-3. H12-(ADP) liposome 投与による肝臓の代謝変動 -metabolome 解析-

前述した実験結果より、機能的変化のおこる time point と予想された投与 6 時間後の肝臓組織を用い、分子量 1,000 以下の生体構成成分の代謝変動を capillary electrophoresis (CE)-MS によるメタボローム・質量分析技術を駆使して予備的な検討を試みた。対照群としては、vehicle 投与群を用いた (各群 n=2)。解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸経路の低分子代謝物の変動を 図 8-10 に示した。H12-(ADP) liposome を負荷す

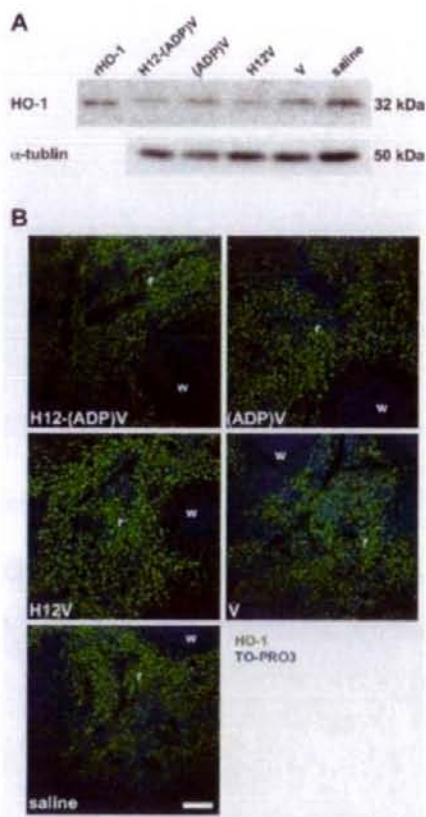


図 6. 脾臓における各 liposome 投与 24 時間後の HO-1 発現 Scale bar: 100 μm 。

No apparent changes in plasma GOT and GPT

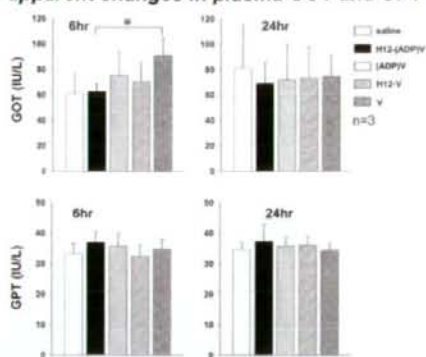


図 7. 血漿 GOT、GPT の変化

ると解糖系、ペントースリン酸経路の構成分子の多くが増加する傾向があることが明らかになった。今後、これらの代謝変動が H12、ADP、あるいは liposome の負荷のいずれに起因するものかを検討する必要がある。

Glycolysis

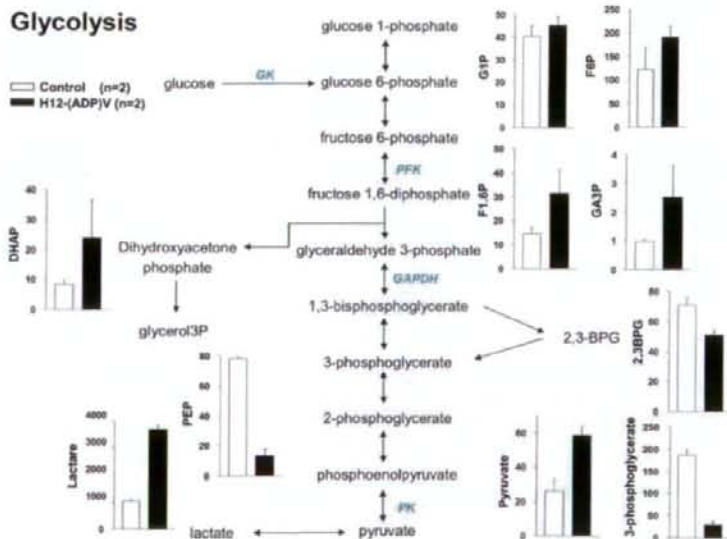


図 8. 解糖系代謝物の変化