

effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress (2007.7., Geneva, Switzerland).

(14) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress (2007.7., Geneva, Switzerland).

(15) Okamura, Y., Fujie, T., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin nanoparticles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. American Chemical Society 232nd National Meeting & Exposition (2006.9.12., San Francisco, USA).

(16) Takeoka, S., and Okamura, Y. Preparation of freestanding nano-adhesive plasters having hetero-surfaces. American Chemical Society 232nd National Meeting & Exposition (2006.9.11., San Francisco, USA).

(17) Mochizuki, Y., Okamura, Y., and Takeoka, S. Synthesis and characterization of human serum albumin gel. 3rd IUPAC-sponsored International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials (MAM-06) (2006.5.31., Tokyo).

(18) Fujie, T., Okamura, Y., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. 3rd IUPAC-sponsored International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials (MAM-06) (2006.5.31., Tokyo, Japan).

(19) Okamura, Y., Goto, T., and Takeoka, S. Preparation of freestanding albumin nano-sheets having hetero-surface. 3rd IUPAC-sponsored International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials (MAM-06) (2006.5.31., Tokyo, Japan).

(20) Okamura, Y., Goto, T., and Takeoka, S. Preparation of albumin nano-sheets using patterning hydrophobic monolayers. Particles 2006; Medical/Biochemical Diagnostic, Pharmaceutical, and Drug Delivery Applications of Particle Technology (2006.5.16., Florida, USA).

(21) Okamura, Y., Fujie, T., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. Particles 2006; Medical/Biochemical

Diagnostic, Pharmaceutical, and Drug Delivery Applications of Particle Technology (2006.5.16., Florida, USA).

(22) 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).

(23) 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).

(24) 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).

(25) 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).

(26) 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).

(27) 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).

(28) 松本 淳, 鎌田徹治, 高木淳一, 岩崎憲治, 由良 敬. 「Elastic Network modelの基準振動解析によるインテグリンの構造変化の解析」第45回 日本生物物理学会年会 (2007.12.21-23., 横浜).

(29) 森木 隆典, 丸山 一郎, 池田 康夫, 村田 満. 「ADAMTS13分子内におけるフォンビルブランド因子結合エピトープ配列」第30回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).

(30) 鈴木 英紀, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「トロンピン刺激によるH12結合リポソームと血小板との相互反応に関する電顕的検討」第30回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).

(31) 岡村 陽介, 武岡 真司, 鈴木 英紀, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 江藤 薫子, 池田 康夫, 半田 誠. 「ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-二リン酸)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30回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).

(32) 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

トによる活性化血小板認識評価」第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11., 大阪).

(33) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 前川 一平, 藤枝俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「止血増幅機能を発現する人工血小板 -血小板凝集をトリガーとして血小板凝集惹起物質を放出するリン脂質小胞体の構築-」第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11., 大阪).

(34) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 福井 慶仁. 「新しいバイオマテリアルとしてのフリースタンディングな高分子ナノシート-血小板代替物からナノ絆創膏までの医用展開-」第 56 回高分子討論会 (2007.9., 富山).

(35) 森川 隆之, 梶村 眞弓, 市川美緒, 星野利津子, 末松 誠. 「Differing effects of cilostazol and aspirin on thrombus formation and microvascular permeability」第 28 回日本炎症・再生医学会 (2007.8.3., 東京).

(36) 半田 誠. 「人工血液の将来展望」第 14 回日本血液代替物学会年次大会「人工血小板」シンポジウム(2007.6., 東京).

(37) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「重篤な血小板減少モデル動物を用いた H12 ペプチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体の止血能評価」第 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).

(38) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 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(アデノシン 5'-二リン酸)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 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).

(39) Kamata T, Handa M, Ikeda Y, Aiso S. 「Separation of the Extracellular Tails Activates  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Integrin.」第 59 回日本細胞生物学会大会 (2007.5.28~30., 福岡).

(40) 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 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(41) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「交互積層法による多糖ナノシートの構築とナノ絆創膏としての応用」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(42) 福井 慶仁, 宇都宮 沙織, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いたポリ乳酸ナノ粒子シートの調製と表裏へテロ修飾」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(43) 岡村 陽介, 宇都宮 沙織, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用

いた微粒子融合シートの構築と表裏へのヘテロ修飾」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(44) 後藤 隆宏, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いたアルブミンナノシートの構築」第 28 回バイオマテリアル学会 (2006.11., 東京).

(45) 宇都宮 沙織, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いた微粒子融合シートの構築と表裏へのヘテロ修飾」第 28 回バイオマテリアル学会 (2006.11., 東京).

(46) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「任意の膜厚を有する(アルギン酸/キトサン)ナノシートの作製」第 28 回バイオマテリアル学会 (2006.11., 東京).

(47) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「H12 ペプチド結合ポアルブミン重合体の PEG 修飾と止血能の延長効果」第 29 回日本血栓止血学会学術集会 (2006.11., 宇都宮).

(48) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と血小板代替物としての止血能増幅効果」第 29 回日本血栓止血学会学術集会 (2006.11., 宇都宮).

(49) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「H12 ペプチド結合ポアルブミン重合体の PEG 修飾と止血能に及ぼす効果」第 44 回日本人工臓器学会大会 (2006.10., 横浜).

(50) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と止血能増幅効果」第 44 回日本人工臓器学会大会 (2006.10., 横浜).

(51) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と止血能増幅効果」第 13 回日本血液代替物学会年次大会 (2006.8., 東京).

(52) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と止血能増幅効果」第 55 回高分子学会年次大会 (2006.5., 名古屋).

(53) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「H12 ペプチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体調製と止血能評価」第 55 回高分子学会年次大会 (2006.5., 名古屋).

(54) 宇都宮 沙織, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用

いた蛋白質吸着マイクロシートの構築」第 55 回高分子学会年次大会 (2006.5., 名古屋).

(55) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と止血効果」第 86 回日本化学会春季年会 (2006.3., 船橋).

(56) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ヘテロ表面を持つ(アルギン酸ナトリウム/キトサン)ナノシートの作製」第 86 回日本化学会春季年会 (2006.3., 船橋).

(57) 後藤 隆宏, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いたアルブミンナノシートの構築」第 86 回日本化学会春季年会 (2006.3., 船橋).

(58) 望月 佑次, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ヒト血清アルブミンゲルの合成及び化学修飾による物性制御」第 86 回日本化学会春季年会 (2006.3., 船橋).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 武岡 真司, 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫. 「薬物運搬体」特願 2007-000296.

(2) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 宇都宮 沙織, 後藤 隆宏 「薄膜状高分子構造体とその調製方法」特願 2006-292688.

## 參考資料

人工血液をつくる (9)  
人工血小板の開発現状

慶應義塾大学 血液・細胞療法部 半田誠

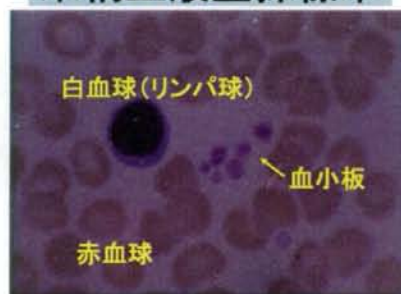
■ 背景と開発経緯

- 人工血小板の性能
- 人工血小板の安全性
- 将来展望

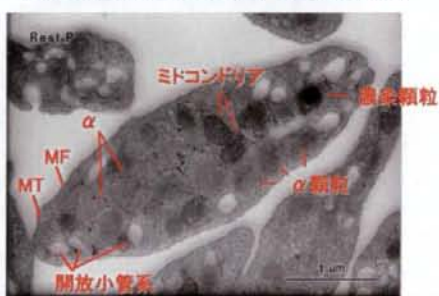
平成18-20年度厚生労働科学研究費補助金  
(政策創薬総合研究事業)  
臨床応用可能な人工血小板としての  
H12結合糖粒子のin vivo評価

(主任研究者) 半田 誠(慶應義塾大学医学部)  
(分担研究者) 池田康夫(慶應義塾大学医学部)  
武岡真司(早稲田大学理工学部)  
梶村真弓(慶應義塾大学医学部)  
後藤信哉(東海大学医学部)  
鈴木英紀(東京都臨床医学総合研究所)  
村田 満(慶應義塾大学医学部)  
(研究協力者) 岡村隆介(早稲田大学理工学部)

末梢血液塗抹標本

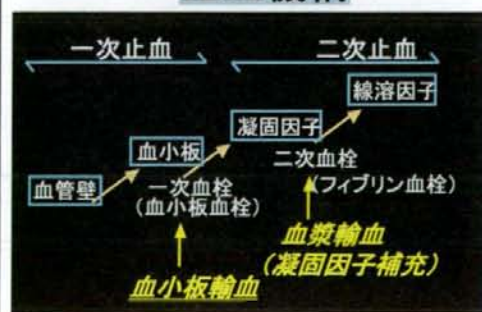


静止血小板の透過型電子顕微鏡像



東京都臨床医学総合研究所鈴木英紀博士提供

止血機構



血小板減少による皮下出血

血小板数: 5,000/μl >



## 血小板輸血



### 濃厚血小板



出血治療  
出血予防

### 輸血用血小板製剤の問題点

- 1) 保存期間、保存条件（緊急対応不可）  
短い：4日間、嚴重：室温・振盪、予約制
- 2) 輸血感染症  
細菌感染：要スクリーニング（欧米）
- 3) 急性副反応  
アレルギー・アナフィラキシー反応など
- 4) 輸血不応  
抗HLA同種抗体、抗HPA同種抗体
- 5) コスト  
濃厚血小板10U：¥ 76,812  
(赤血球濃厚液2U：¥ 16,338)

### 血小板製剤：室温、震盪



### 人工血小板の利点

- 1) 緊急時の輸血対応が容易
- 2) 輸血感染症のリスクがない
- 3) 安定した血液行政が可能

### 血小板機能発現に重要な分子\*

#### \* 受容体とリガンド



### 我々の人工血小板

設計戦略：

- #1 担体(微粒子)：アルブミン重合体、リボソーム
- #2 認識分子：血小板接着受容体とリガンド
- #3 材料：遺伝子組換え体、合成物質(ヒト由来産物は使用せず)

完全な人工産物



## 人工血小板に担持させる分子の選択

### 1. 粘着機能発現

<受容体:リコンビナント蛋白>

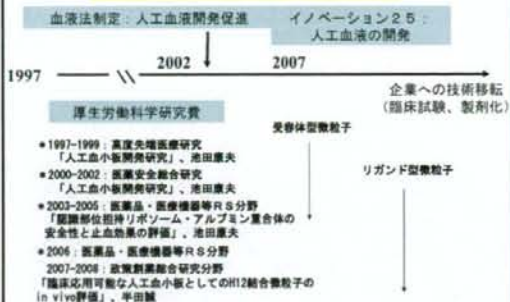
- GPIb $\alpha$  (vWf レセプター)
- GPIIb/IIIa (コラーゲンレセプター)

### 2. 凝集増強

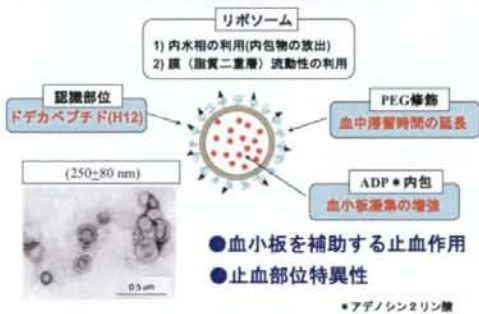
<リガンド:合成ペプチド>

- フィブリノーゲン ドデカペプチド (H12)

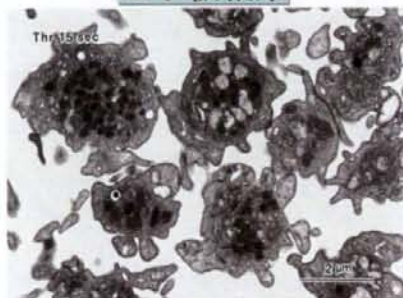
## 人工血小板/血小板代替物の開発



## 人工血小板プロトタイプの絞込み

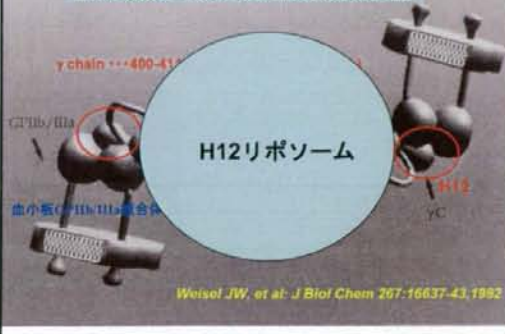


## 血小板凝集

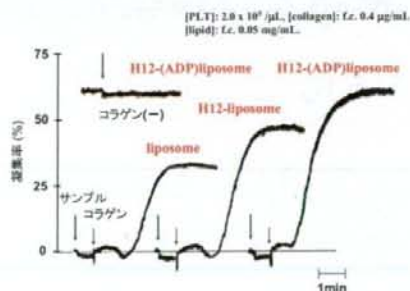


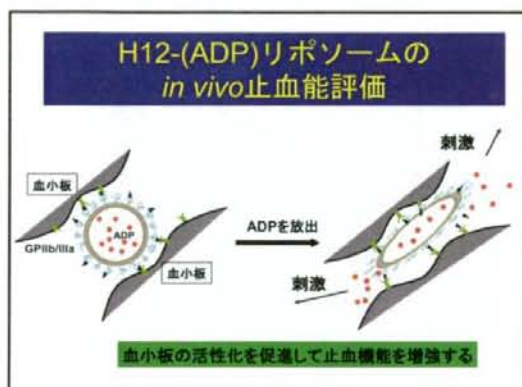
東京都臨床医学総合研究所鈴木英紀博士提供

## 血小板凝集:フィブリノーゲンと血小板の結合部位



## H12(ADP)リポソームの血小板凝集促進効果

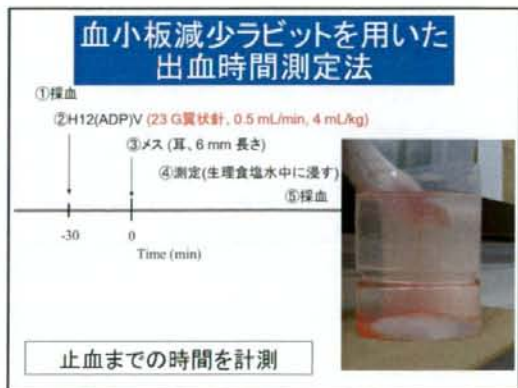




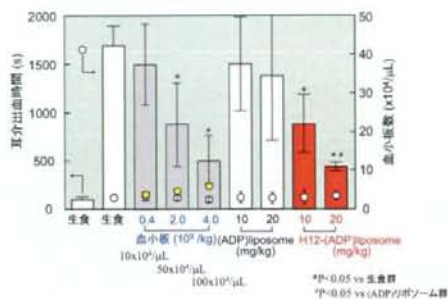
- 人工血液をつくる (9) 人工血小板の開発現状**
- 背景と開発の経緯
  - 人工血小板の性能
  - 人工血小板の安全性
  - 将来展望

**H12-(ADP)リボソームの止血機能: 血小板減少ウサギでの検討**

(1) 耳介出血時間の短縮  
(2) 腹部術創出血量の減少



**H12-(ADP)リボソームの止血効果  
血小板減少ウサギの出血時間**

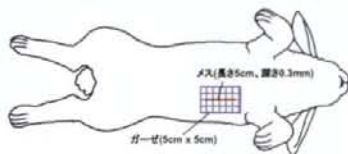


**H12-(ADP)リボソームの止血機能：  
血小板減少ウサギでの検討**

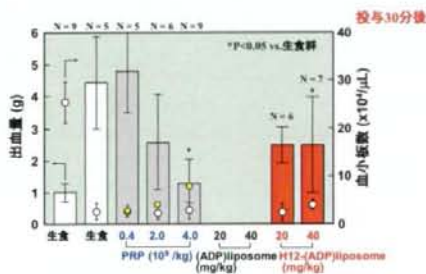
- (1) 耳介出血時間の短縮
- (2) 腹部術創出血量の減少

**腹部手術モデルを用いたH12-(ADP)リボソームの止血効果**

- 出血量 (blood loss) の測定法
- 1) 前腹壁 (anterior abdominal wall) に、切傷 (長さ5 cm、深さ0.3 cm) する。
  - 2) あらかじめ重量を測定したガーゼ (5 x 5 cm) を傷口に置き、5分間血液を吸収させる。
  - 3) ガーゼの重量測定 (出血量)



**腹部手術モデルを用いたH12-(ADP)リボソームの止血効果**



**H12-(ADP)リボソームの止血効果  
血小板と比較**

ウサギ

ヒト

血小板

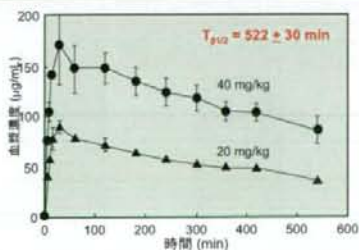
2-3 μm  
4.0x10<sup>9</sup> 個/kg → 4.0x10<sup>9</sup> 個/kg  
(8.2x10<sup>10</sup> μm<sup>3</sup>/kg) (10単位、2.0x10<sup>11</sup> 個<)  
4.0x10<sup>4</sup> 個/μl の増加 4.0x10<sup>4</sup> 個/μl の増加

H12(ADP)リボソーム

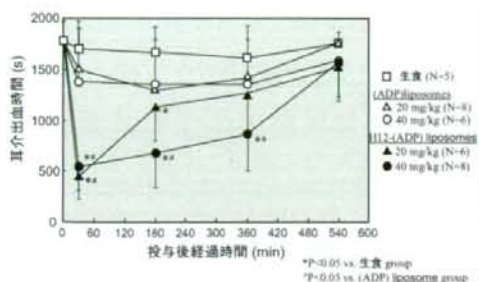
250-300 nm  
2.0x10<sup>13</sup> 個/kg → 血小板に匹敵する止血効果が期待される  
(4.1x10<sup>11</sup> μm<sup>3</sup>/kg)

**H12(ADP)リボソームの血中濃度推移 (N=3)  
正常ウサギ**

H12(ADP)リボソーム (DIOC<sub>12</sub> 20.40 mg/kg) → 採血 (200 μL) → centrifugation (12500rpm, 5 min) → 上清を可溶性化 (1% C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>, 5 min) → Fluorescent intensity (λ<sub>ex</sub>: 495 nm, λ<sub>em</sub>: 510 nm)



### H12-(ADP)リボソームの止血能持続効果



### 人工血液をつくる (9)

#### 人工血小板の開発現状

- 背景と開発の経緯
- 人工血小板の性能
- 人工血小板の安全性
- 将来展望

### CT観察の流れ

動物: Wistar雄性ラット (250-300 g)

① H12-(iopamidol)小胞体 (130 mg/kg, i.v.)

② メス (尾静脈, 10 mm 長さ)

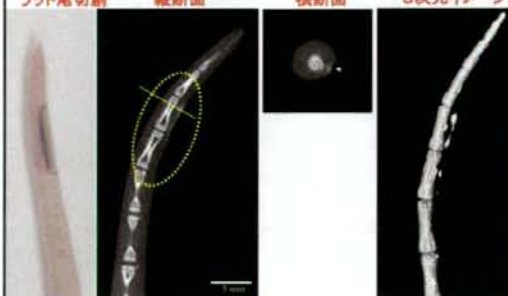
③ 出血 (生理食塩水中に浸す) ④ 犠牲死 (止血するまで)

⑤ CT観察



### H12-(iopamidol)リボソームの出血部位への特異的集積

ラット尾切断 縦断面 横断面 3次元イメージ



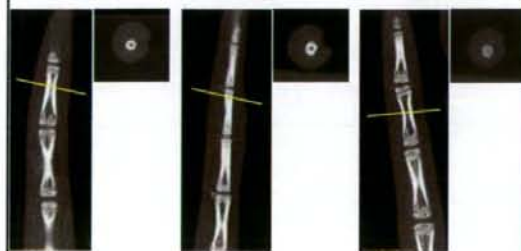
### H12-(iopamidol)リボソームの出血部位への特異的集積

(対照試験)

生食

造影剤

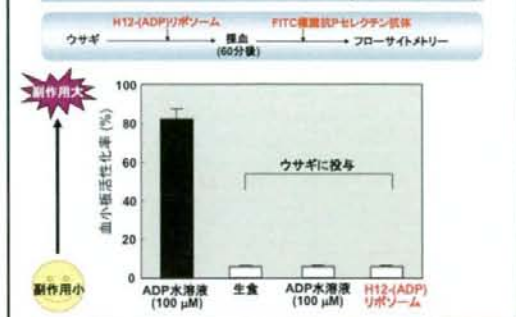
(造影剤)リボソーム



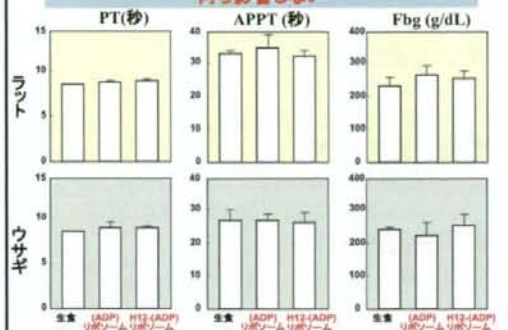
### H12-(ADP)リボソームの安全性

- (1) 流血中で血小板を刺激するか否か
- (2) 凝固系を刺激するの否か

### H12-(ADP)リボソームは通常血流中では、正常血小板を活性化させない (in vivo実験)



### H12-(ADP)リボソームは血液凝固系には何ら影響しない



### 人工血液をつくる (9) 人工血小板の開発現状

- 背景と開発の経緯
- 人工血小板の性能
- 人工血小板の安全性
- 将来展望

### 現在までの研究成果

*Biomacromolecules* 2:1192-1197 (2001), *Biochem Biophys Res Commun* 296:765-770 (2002), *ibid* 306:256-260 (2003), *ibid* 312:773-779 (2003), *Transfusion* 45: 1221-1228 (2005), *Transfusion* 47: 1254-1262 (2007), *Transfusion Med* 18:158-166 (2008), *J Thromb Haemost* (2009) in press

- 血小板輸血に匹敵する止血効果 (血小板減少動物) を示す人工微粒子 (人工血小板: H12-(ADP) リボソーム) が創製された。
- 人工血小板は十分な血中滞留性を保持し、生体内での血小板の活性化や血液凝固系への影響は認められなかった。

### 血小板代替物



### 人工血小板の条件

- 1) 血小板機能をすべて兼ね備える必要は無いが、止血に必要な最小限の機能を有し、残存血小板機能を補強、増幅し得る。
- 2) 血流中で血栓を形成しない。
- 3) 正常血小板の産生を抑制しない。
- 4) その他: 長期保存可能で常時使用可能  
反復投与が可能  
副作用がない  
低コストである

## これからの課題

- 止血機能の最適化
  - 急性出血治療モデルでの検討
  - 血中滞留時間の延長
- 安全性の評価
  - 血栓性（病的血栓誘発）
  - 抗原性（単回投与と反復投与）
- 薬物動態解析

## 分担研究報告

平成 18-20 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)小胞体の止血能評価とその血中動態、臓器分布**

分担研究者 池田 康夫 (慶応義塾大学 医学部 血液内科, 教授)  
研究協力者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)  
岡村 陽介 (早稲田大学 理工学術院 理工学研究所, ヒューマンサイエ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)  
丸山 仁美 (慶應義塾大学 医学部 血液内科, 研究員)

**研究要旨**

血小板止血機能を補助する微粒子系の開発において、フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖 C 末端ドデカペプチド(HHLGGAKQAGDV: H12)をポリエチレングリコール(PEG)鎖末端に担持させた表リン脂質小胞体は、活性化血小板表面に発現される GPIIb/IIIa を認識、架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少ラットの出血時間を短縮させることを既に報告してきた。

平成 18 年度は、更なる止血能向上のために、血小板凝集惹起剤であるアデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内包させた H12 結合小胞体(H12-(ADP)小胞体)を調製し、止血能評価を行った。H12-小胞体は、H12 を担持したときのみ血小板凝集を促進させ、血小板凝集塊中でのみ内包物(モデル蛍光物質: カルボキシフルオロセイン(CF))を放出させる機構を初めて明らかにした。そこで、CF の代わりに ADP を内包したところ、内水相に 1mM 以上の ADP を内包させた H12-(ADP)小胞体は、H12 の多点結合と ADP 放出の相乗効果によって、血小板凝集を顕著に増大させることを立証できた。血小板減少ラットに H12-(ADP)小胞体を投与したところ、投与量依存的に有意に出血時間を短縮させ、ADP 未内包の H12-小胞体で出血時間の短縮効果が確認できた 1/4 の投与量でも同程度の短縮効果が得られた。次に、血小板減少ウサギに H12-(ADP)小胞体を投与したところ、投与量依存的に有意に血小板減少モデルウサギの出血時間を短縮させ、血小板輸血群のそれに匹敵する効果が示された。

平成 19 年度は、血小板減少ウサギを用いて H12-(ADP)小胞体の止血能持続効果と血中濃度推移との関係を明らかにすると共に、血小板減少患者の外科手術への適応を想定し、従来の出血時間測定系よりも出血性の高い評価系(腹部手術モデルの出血量測定法)を新たに確立し、止血能の測定を行った。まず、H12-(ADP)小胞体を 20、40 mg/kg で投与したところ、生理食塩水群、(ADP)小胞体群と比較して投与 6 時間後まで有意に高い出血時間の短縮効果を示した。この効果は、H12-(ADP)小胞体の血中濃度に依存し、有効血中濃度は 100



μg/mL 以上であると算出された。他方、腹部手術モデルの出血量測定法を確立した。この評価法を用いて血小板減少症モデルウサギに H12-(ADP)小胞体を投与したところ、投与量依存的に出血量を有意に減少させ、血小板輸血群のそれに匹敵した。従って、血小板減少患者の外科手術に対する H12-(ADP)小胞体の適応の可能性も示すことができた。

平成 20 年度は、放射性同位元素(RI, [8-<sup>14</sup>C]ADP, [1,2-<sup>3</sup>H]cholesterol)を用いて、内水相の ADP と小胞体膜構成成分の cholesterol の一部を 2 重標識した H12-(ADP)小胞体を調製し、H12-(ADP)小胞体の体内動態(血中濃度推移、臓器分布)を明らかにすることを目的とした。H12-(ADP)小胞体は、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、その後徐々に両者の乖離が見られた( $T_{0.1/2}$ : <sup>3</sup>H: 1.8 hr, <sup>14</sup>C: 2.2 hr,  $T_{0.1/2}$ : <sup>3</sup>H: 30.1 hr, <sup>14</sup>C: 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。投与した H12-(ADP)小胞体は主に脾臓に集積することが明らかになった。また、最高血中濃度( $C_{max}$ )と血中濃度-時間曲線下面積( $AUC_{24hr}$ )は投与量に比例し、消失速度(CL)は投与量によらずほぼ一定であることから、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断定した。さらに、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。

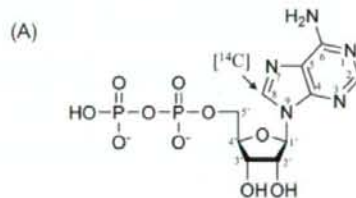
#### A. 研究目的

血小板止血機能を補助する微粒粒子系の開発において、フィブリノーゲンγ鎖 C 末端ドデカペプチド(HHLGGAKQAGDV: H12)をポリエチレングリコール(PEG)鎖末端に担持させたリン脂質小胞体は、活性化血小板表面に発現される GPIIb/IIIa を認識、架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少ラットの出血時間を短縮させることを既に報告してきた<sup>1)</sup>。

平成 18 年度は、更なる止血能向上のために、血小板凝集惹起剤であるアデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内包させた H12 結合小胞体(H12-(ADP)小胞体)を調製し、(1) ADP 放出特性、(2) 血小板減少モデルラットを用いた止血能評価、(3) 血小板減少ウサギを用いた止血能評価(平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金 研究報告書にて確立)を行った。

平成 19 年度は、血小板減少モデルウサギを用いて H12-(ADP)小胞体の止血能持続効果と血中濃度推移との関係を明らかにすると共に、血小板減少患者の外科手術への適応を想定して腹部手術モデルの出血量測定法を新たに確立し、止血能測定を行った。

平成 20 年度は、放射性同位元素(RI, [8-<sup>14</sup>C]ADP, [1,2-<sup>3</sup>H]cholesterol, Fig. 1)を用いて、内水相の ADP と小胞体膜構成成分の cholesterol の一部を 2 重標識した H12-(ADP)小胞体を調製し、H12-(ADP)小胞体の体内動態(血中濃度推移、臓器分布)を明らかにすることを目的とした。



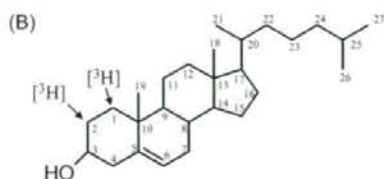


Fig. 1 Structure of [8-<sup>14</sup>C]ADP (A) and [1,2-<sup>3</sup>H]cholesterol (B).

1) Okamura, Y. *et al. Bioconjugate Chem.* **16**, 1589-1596 (2005).

## B. 研究方法

### 1. H12-(ADP)小胞体の止血能増幅効果 (平成18年度)

#### 1.1. H12 結合 PEG 脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成

##### 1.1.1. 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。

##### 1.1.2. 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。

#### 1.1.3. 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。

#### 1.2. H12-(ADP)小胞体、H12-(CF)小胞体の調製法

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) (1000 mg, 1.36 mmol)、cholesterol (527 mg, 1.36 mmol)、1,5-Dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSGL) (190 mg, 136 μmol)、PEG-DSPE (47.4 mg, 8.17 μmol)、H12-PEG-Glu2C18 (43.4 mg, 8.17 μmol)をベンゼン 20 mL に溶解し、凍結乾燥した (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18=5/5/1/0.03/0.03, モル比)。ADP 水溶液(0, 1, 10, 25, 100 mM)にて水和、エクストルージョン法を経て H12-(ADP)小胞体を調製した (粒径 250 ± 80 nm)。超遠心分離(100,000g, 30 min, 4°C)後、PBS 5 mL 中に分散させ小胞体分散液とした。さらに、小胞体分散液をゲルろ過 (sephadex G25)し、外水相に微量に残存する ADP を完全に除去した。ADP 内包濃度は、

H12-(ADP)小胞体(脂質濃度: 1 mg/mL)を2% (v/v)ラウリルエーテル水溶液にて可溶化し、高速液体クロマトグラフィー(TSKGel G3000PW<sub>XL</sub>, 1 mL/min, Ab. 260 nm)を用いて定量した。

同様の方法にて、ADPの代わりに水溶性蛍光分子のカルボキシフルオロセイン(CF, 1mM)を内包させてH12-(CF)小胞体とした。

### 1.3. 血小板凝集計を用いた H12-(CF)小胞体からの CF 放出率の測定法

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。H12-(CF)小胞体([lipid] = f.c. 0.05 mg/mL)をPRP ([PLT] =  $20 \times 10^4$  / $\mu$ L)に添加後、ADP (f.c. 3  $\mu$ M)あるいはコラーゲン(f.c. 0.4 mg/mL)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて透過率変化を測定した。

測定終了後、遠心分離(10,000 rpm, 5 min)にて血小板凝集塊を除去した。このとき、ADP未内包系において、血小板のみを除去し、2%ラウリルエーテル(C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>)にて小胞体を可溶化した際の蛍光強度(A)の値を100%と定義した。この上清中(小胞体分散液)の蛍光強度(B)を測定し、血小板凝集塊への小胞体取込み率を算出した。さらに、この上清を遠心分離(100,000g, 30 min)して小胞体を除去し、その上清の蛍光強度(C)を測定し、血小板凝集塊に取込まれた小胞体からのCF放出率を算出した。

$$\text{小胞体取込み率 (\%)} = \frac{A-(B-C)}{A} \times 100$$

$$\text{CF 放出率 (\%)} = \frac{C}{A-(B-C)} \times 100$$

### 1.4. フローサイトメトリーを用いた安全性評価

PRP ([PLT]= $1.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, 50  $\mu$ L)にADP内包濃度の異なるH12-(ADP)小胞体を添加し([lipid] = 1 mg/mL, 10  $\mu$ L)、攪拌した(37°C, 10 min)。血小板活性化マーカーであるFITC標識PAC-1 (20  $\mu$ L)を添加後、振とうし(37°C, 10 min)、ホルムアルデヒド(f.c. 1.5%)にて固定した。陽性対照群はADP刺激時とし、陰性対照群はADP未内包のPEG小胞体とした。

### 1.5. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

Wister系雄性ラット(三協ラボ, 8週齢, 250-270 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)、投与開始後10日目を血小板減少ラット ([PLT]=( $19.6 \pm 2.6$ )  $\times 10^4$  / $\mu$ L)とした。セボフラン麻酔後、H12-(ADP)小胞体を尾静脈から投与した (4 mL/kg)。また、生理食塩水を陰性対照群とした。投与5分経過後、尾先端から1 cmの部位にクイックヒール (ベクトン・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中に浸し出血時間を測定した。また、検体投与5分前、投与30分後に採血し、血球測定装置(K-4500, Sysmex)にて各血球を測定した。

### 1.6. 血小板減少ウサギを用いた止血能評価

ニュージーランドホワイトウサギ (雄性, 11週齢, 2.5 kg)は、三協ラボより購入した。ケタミン (60 mg/mL)とセラクタール(2%)の混合溶液 (ケタミン/セラクタール=3/1 (v/v), 2 mL)にて麻酔後、ブスルファン ポリエチレングリコール溶液 (10 mg/mL)を0, 3

日目に下腹部皮下投与した(全投与量 30 mg/kg)。投与開始後 15 日目を血小板減少ウサギ([PLT] =  $2.6 \pm 0.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$ )とした。ケタミン/セラクター麻酔後、23G 翼状針を装着したシリンジポンプにて検体(H12-(ADP)小胞体、生理食塩水、PRP([PLT] = 10-100  $\times 10^4 / \mu\text{L}$ ))を耳静脈から投与した(4 mL/kg, 0.5 mL/min)。投与開始から 30 分経過後、耳の血管が確認できない部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(長さ 6 mm)。耳の切傷部位を生理食塩水中に浸し出血時間を測定した。

## 2. H12-(ADP)小胞体の止血能持続効果と腹部手術モデルでの止血能評価 (平成 19 年度)

### 2.1. 血小板減少症モデルウサギを用いた耳介周囲部位の出血時間測定

血小板減少症モデルウサギ ([PLT] =  $(2.6 \pm 0.8) \times 10^4 / \mu\text{L}$ )にケタミン/セラクター麻酔後、23G 翼状針を装着したシリンジポンプにて試料 (H12-(ADP)小胞体([lipid] = 20, 40 mg/kg)、生理食塩水、ウサギ多血小板血漿 (PRP, [PLT] = 10, 50, 100  $\times 10^4 / \mu\text{L}$ ))を耳静脈から投与した(4 mL/kg, 0.5 mL/min)。投与開始から 30、180、360、540 分経過後、耳の血管が目視できない部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(長さ 6 mm)。耳の切傷部位を生理食塩水中に浸し出血時間を測定した。

### 2.2. 血中濃度推移の測定法

Diioctadecyloxacarboxyanine perchlorate (DiOC<sub>18</sub>)標識 H12-(ADP)小胞体あるいは (ADP)小胞体を血小板減少症モデルウサギに耳静脈から投与し([lipid] = 20, 40 mg/kg)、

経時的に採血した。遠心分離後(10000 rpm, 5 min, r.t.)、得られた上清に deca(oxyethylene) dodecyl ether (C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>)を添加し、蛍光測定した(ARVO™ SX, E<sub>x</sub> = 485 nm, E<sub>m</sub> = 500 nm)。

### 2.3. 血小板減少症モデルウサギの腹部手術モデルを用いた出血量測定

血小板減少症モデルウサギに H12-(ADP)小胞体あるいはウサギ PRP を耳静脈より投与し ([lipid] = 40 mg/kg, [PRP] = 10, 50, 100  $\times 10^4 / \mu\text{L}$ )、0.5 mL/min、4 mL/kg)、前腹壁にメス(No.11)で傷 (長さ 5 cm、深さ 0.3 cm)をつけた。あらかじめ重量を測定したガーゼ (5  $\times$  5 cm)を傷口に乗せ、5 分間血液を吸収させた後、ガーゼの重量を測定し、出血量を算出した (Fig. 2)。

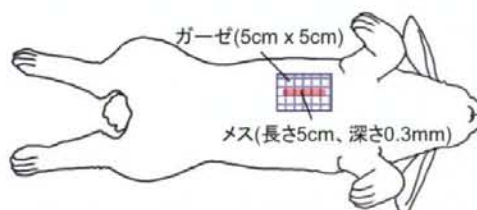


Fig. 2 Surgery wound model in thrombocytopenic rabbits.

### 2.4. ラット、ウサギ、ヒト血小板を用いた H12 の ADP 凝集阻害能

ラット全血(1/10 (v/v) 3.18 % クエン酸ナトリウム)<sup>2)</sup>、ウサギ全血(1/10 (v/v) 3.8 % クエン酸ナトリウム)、ヒト全血(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.)、PRP を得た。PRP ([PLT] = 20  $\times 10^4 / \mu\text{L}$ )に濃度の異なる H12 水溶液 (f.c. 0.125-4 mM)を添加後、5 分間振とうさせた。ADP (f.c. 20  $\mu\text{M}$ )にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて透過率変化を測定し IC<sub>50</sub> を算出した (SAS 前臨床パッ