

ページ Version5.0)。

(2) Sudo, T. *et al.*, *Platelets*, **14**, 239-246 (2003).

### 3. RI 標識 H12-(ADP)小胞体の調製とその 血中動態、臓器分布 (平成 19 年度)

#### 3.1. RI 標識 H12-(ADP)小胞体の調製法

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl choline (DPPC) (100 mg, 136  $\mu$ mol)、cholesterol (52.7 mg, 136  $\mu$ mol)、1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) (19.0 mg, 13.6  $\mu$ mol)、PEG-DSPE (4.7 mg, 0.82  $\mu$ mol)、H12-PEG-Glu2C18 (4.3 mg, 0.82  $\mu$ mol)をベンゼンに溶解させ、凍結乾燥させた (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18=5/5/1/0.03/0.03, モル比)。[8-<sup>14</sup>C]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、遠心分離にて精製した(100,000g, 30 min, 4°C)。次いで、[1,2-<sup>3</sup>H]cholesterol (20  $\mu$ M, 25  $\mu$ L; 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 H12-(ADP)小胞体を得た。

#### 3.2. 血中濃度推移測定

Wistar 系雄性ラット(三協ラボサービス, 8 週齢、250-300 g)に RI 標識 H12-(ADP)小胞体あるいは(ADP)小胞体を尾静脈投与した ([lipid] = 10, 20, 40 mg/kg)。投与開始 5, 10, 15, 30 min, 1, 3, 6, 9, 24 hr 後に採血し (50  $\mu$ L)、Solvable<sup>®</sup> (2 mL, PerkinElmer 社製)を加えて可溶化し (r.t., 1 hr)、過酸化水素 (400  $\mu$ L)にて脱色した。その後、Hionic Fluor<sup>®</sup> (15 mL, PerkinElmer 社製)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。他方、ADP 水溶液 (1 mM, PBS(pH 7.4))と [8-<sup>14</sup>C]ADP 水溶液 (3.7 MBq/mL)の混合液を尾静脈投与し (4 mL/kg)、同様の測定を行った。

各薬物動態パラメータ(血中半減期 ( $T_{0.5}$ ),  $T_{0.5(1/2)}$ ), 最高血中濃度 ( $C_{max}$ ), 薬物消失速度 (CL), 血中濃度 - 時間曲線下面積 ( $AUC_{24hr}$ ) は、WinNonlin professional version5.2.1<sup>®</sup> (Pharsight 社)で解析した。

#### 3.3. 臓器分布測定

3.2で投与したラットを 24 時間後に犠牲死させた。脳、心臓、肺、胃、消化管、腎臓、膀胱を摘出し、ホモジナイズした。また、肝臓、脾臓、尿、糞は投与開始 3、6、9、24 時間後に経時的に採取しそれぞれ均一な状態にした。各臓器を 50-100 mg 秤量し、Solvable<sup>®</sup> (2 mL)を加えて可溶化し(60°C, 1 hr)、過酸化水素 (400  $\mu$ L)にて脱色した(r.t., 1 hr)。その後、Hionic Fluor<sup>®</sup> (15 mL)を添加し LSC にて測定した。他方、ADP 水溶液(1 mM, PBS(pH 7.4))と [8-<sup>14</sup>C]ADP 水溶液 (3.7 MBq/mL)の混合液を尾静脈投与し(4 mL/kg)、同様の測定を行った。

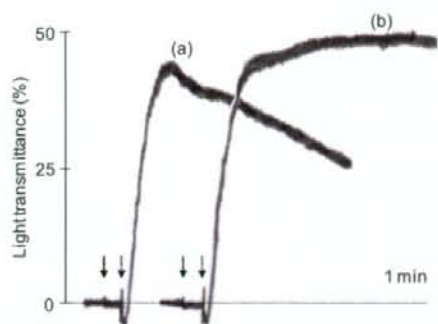
## **C 研究結果及び考察**

### 1. H12-(ADP)小胞体の止血能増幅効果

#### 1.1. H12-(CF)小胞体からの CF 放出率測定

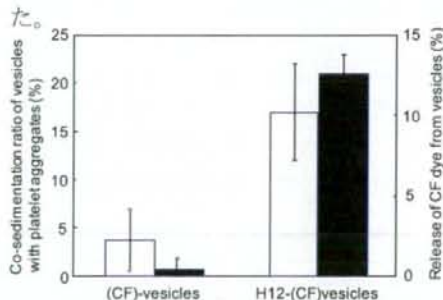
(CF)小胞体を PRP に添加し、ADP (f.c. 3  $\mu$ M)にて血小板凝集を惹起させたところ、PBS 添加系と比較して血小板凝集に何ら影響を与えないことを確認した(Fig. 3 (b))。(CF)小胞体の代わりに H12-(CF)小胞体を添加したところ、透過度が顕著に増大し、血小板の 2 次凝集促進効果が確認できた(Fig. 3 (a))。これは、H12-(CF)小胞体が H12 を介

して血小板と多点結合し、血小板凝集を促進したためと考えられる。



**Fig. 3** ADP-induced platelet aggregation in the presence of H12-(CF)vesicles. [platelet]:  $20 \times 10^4$  / $\mu$ L, [ADP]: f.c.  $3 \mu$ M, [lipid]: f.c.  $0.05$  mg/mL. (a) H12-(CF)vesicles, (b) (CF)vesicles.

H12-(CF)小胞体、(CF)小胞体の血小板凝集塊への取込み率は、それぞれ  $17 \pm 5\%$ 、 $3 \pm 1\%$ であり、両者ともほぼ同等であった。そこで、取込まれた小胞体からのCF放出率を測定したところ、それぞれ  $10 \pm 1\%$ 、 $0.6 \pm 0.5\%$ となった(**Fig. 4**)。これは、小胞体表面にH12を担持させたことにより、血小板との結合が強固となり、血小板凝集に巻き込まれた際の物理的な刺激に伴ってCF放出率が増大したためと考えられる。従って、H12-小胞体へADP等の生理活性物質を内包することで凝集塊中のみで内包物が放出し、凝集を促進させる機構を初めて明らかにした。

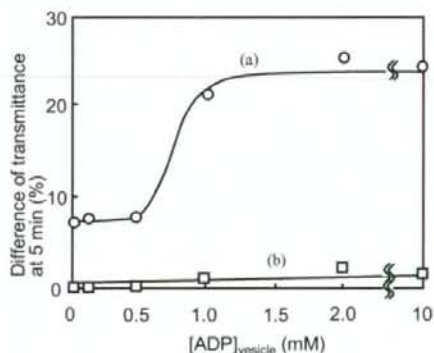


**Fig. 4** Co-sedimentation ratio of H12-(CF) vesicles with a platelet aggregates (white column) and CF released from these liposomes into supernatant after platelet aggregation (black column). [platelet]:  $20 \times 10^4$  / $\mu$ L, [ADP]: f.c.  $3 \mu$ M, [lipid]: f.c.  $0.05$  mg/mL.

## 1.2. 血小板凝集計を用いたADP内包濃度の最適化

ADP内包濃度が0-10 mMのH12-(ADP)小胞体並びに(ADP)小胞体をPRPに添加し、ADP(f.c.  $3 \mu$ M)にて血小板凝集を惹起させ、惹起5分後の透過率を計測した。このとき、ADP未内包の小胞体添加時の透過率との差より判定した。

H12-(ADP)小胞体を添加したところ、内包濃度1 mM未満では透過率は約8%増大し、血小板凝集の促進効果が示された(**Fig. 5 (a)**)。



**Fig. 5** Enhancement effect of platelet aggregation in the presence of (a) H12-(ADP)vesicle or (b) (ADP)vesicle. [platelet]:  $20 \times 10^4$  / $\mu$ L, [ADP]: f.c.  $2 \mu$ M, [lipid]: f.c.  $0.05$  mg/mL.

これは、ADP未内包のH12-小胞体とほぼ同等であったことから、小胞体表面のH12によって血小板と多点結合し、血小板凝集を促進したためと考えられる。内包濃度1 mM以上では、透過率は25%まで顕著に増大した。これは、H12の担持による多点結合とADP放出の相乗効果によるものと示唆される。他方、(ADP)小胞体添加系ではいずれの濃度においてもその効果は確認されなかった(**Fig. 5 (b)**)。従って、ADP最適濃度は、ADP放出の相乗効果を示す最低濃度1 mMに決定した。以下の実験はすべて1 mMと

した。

さらに、ADP の代わりにコラーゲンにて血小板を惹起させた結果を Fig. 6 に示す。H12-(ADP)小胞体(b)は、Fig. 3 と同様に、H12-小胞体(a)の透過率と比較して高い凝集促進効果が確認できた。また、H12-小胞体(a)の添加系では、コラーゲン添加から約 1 分後に、コラーゲン凝集に特有の血小板形態変化に伴う緩やかな透過率の減少が見られる。他方、ADP 内包系(b)では、コラーゲン添加後、直ちに透過率の上昇が見られ、これは ADP 凝集に特有の現象である。従って、H12-(ADP)小胞体から ADP 放出が誘起されたことを示唆する結果であると考えられる。

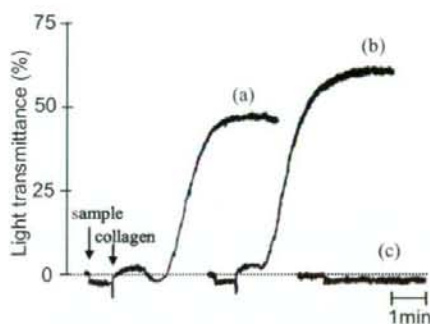


Fig. 6 Collagen-induced platelet aggregation in the presence of H12-(ADP)vesicle. [platelet]:  $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ , [collagen]: f.c. 0.4 mg/mL, [lipid]: f.c. 0.05 mg/mL. (a) H12-vesicles, (b) H12-(ADP)vesicles, (c) H12-(ADP)vesicles (collagen non-stimulation).

### 1.3. 血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価

血小板減少ラット([PLT]= $19.6 \pm 2.6$ )  $\times 10^4 / \mu\text{L}$ )に生理食塩水を投与したところ、出血時間は  $682 \pm 198$  秒であり、正常ラット([PLT]= $80 \times 10^4 / \mu\text{L}$ )の出血時間( $178 \pm 56$  秒)と比較して、約 3.8 倍延長した(Fig. 7)。脂質濃度を 2.5、10 mg/mL に調整した H12-小胞体分散液を投与したところ、投与量依

存的に出血時間を短縮させ 10、40 mg/kg(脂質量換算)における出血時間は、それぞれ  $573 \pm 127$ 、 $335 \pm 96$  秒であった。そこで、脂質濃度 0.25、1、2.5 mg/mL に調整した H12-(ADP)小胞体分散液を投与したところ(4 mL/kg)、1、4、10 mg/kg(脂質量換算)における出血時間は、それぞれ  $543 \pm 134$ 、 $521 \pm 88$ 、 $349 \pm 49$  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ることが立証できた。

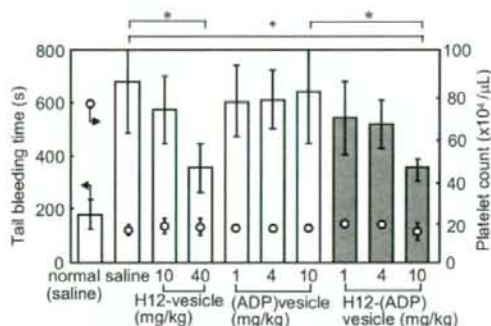


Fig. 7 Effects of the administration of H12-(ADP)vesicles on tail bleeding time (gray bars). The administered amount of H12-(ADP)vesicles was 1, 4, 10 mg/kg equivalent of lipid. ○: platelet count in the rats (N = 8-12).

また、H12-(ADP)小胞体の投与 5 分前、投与 30 分後の各血球は何ら影響しないことを確認した(Fig. 8)。

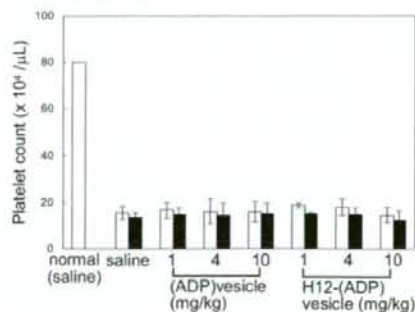


Fig. 8 Platelet counts before (white column) and after (black column) H12-(ADP)vesicles injection.

### 1.4. 血小板減少症モデルウサギを用いた止血

## 血能評価

血小板減少ウサギ([PLT] =  $2.6 \pm 0.8 \times 10^4$  / $\mu$ L)に生理食塩水を投与したところ(4 mL/kg)、出血時間は  $1695 \pm 197$  秒であり、正常ウサギ([PLT] =  $41 \times 10^4$  / $\mu$ L)のそれ( $112 \pm 24$  秒)と比較して約 15 倍延長した(Fig. 9)。陽性対照群としてウサギ血小板を  $0.4 \times 10^9$ 、 $2.0 \times 10^9$ 、 $4.0 \times 10^9$  PLT/kg ( $1.0 \times 10^9$ 、 $5.0 \times 10^9$ 、 $1.0 \times 10^{10}$  PLT に相当)で投与したところ、投与血小板数依存的に出血時間を短縮させた(それぞれ  $1505 \pm 410$ 、 $863 \pm 440$ 、 $505 \pm 257$  秒)。

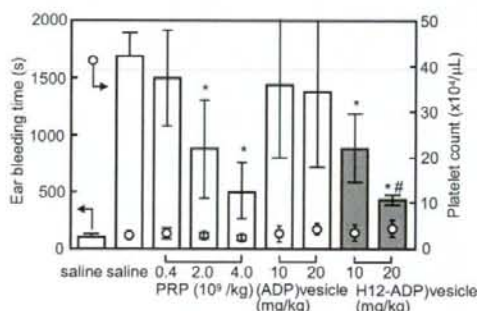


Fig. 9 Effects of the administration of H12-(ADP)vesicles and PRP on ear bleeding time. The administered amount of H12-(ADP)vesicles was 10, 20 mg/kg, and PRP was 0.4, 2.0,  $4.0 \times 10^9$ /kg. ○; platelet count in the rabbits (N = 6). \*P<0.05 vs. saline groups, and #P<0.05 vs. (ADP)vesicles group at the same dose.

次に、H12-(ADP)小胞体をそれぞれ 10、20 mg/kg (脂質量換算、約  $2.5 \times 10^{13}$ 、 $5.0 \times 10^{13}$  粒子に相当)で投与したところ、出血時間はそれぞれ  $881 \pm 303$ 、 $428 \pm 44$  秒であり、生理食塩水群( $1696 \pm 197$  秒)あるいは(ADP)小胞体群(10、20 mg/kg で  $1429 \pm 643$ 、 $1375 \pm 663$  秒)と比較して、投与量依存的に有意に出血時間を短縮させ、血小板投与群のそれに匹敵した。従って、H12-(ADP)小胞体は血小板減少ウサギの出血時間を効率よく短縮させる微粒子であることが確認できた。

## 1.5. フローサイトメトリーを用いた安全性試験

ADP の内包濃度が 10 mM 以下の H12-(ADP)小胞体あるいは(ADP)小胞体を血小板に添加した系では、ADP 未内包小胞体添加系と比較して PAC-1 結合率はほぼ同等であり、血小板を活性化させないことを確認した(Fig. 10)。しかし、内包濃度のもっとも高い H12-(ADP)小胞体、(ADP)小胞体(100 mM)を血小板に添加した系では、血小板の活性化を引き起こすことが判明した。これは、内水相と外水相との浸透圧差に伴う ADP の漏出と考えられる。従って、ADP 放出の相乗効果を示す ADP 内包濃度が 1 mM で調製した小胞体は、血小板を活性化させず、安全性の高い微粒子であることが再確認できた。

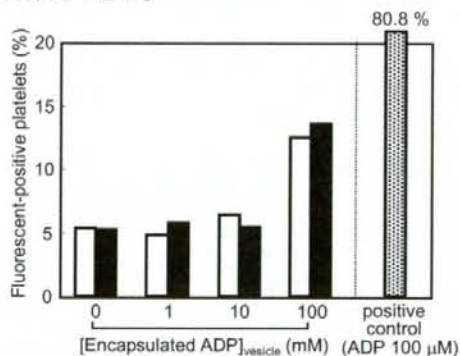


Fig. 10 PAC-1 binding to the platelets in the presence of H12-(ADP)vesicles (black column) and (ADP)vesicle (white column with various encapsulated ADP concentration).

## 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

### 2.1. 出血時間測定による H12-(ADP)小胞体の止血能持続効果と血中濃度推移

H12-(ADP)小胞体をそれぞれ 20、40 mg/kg で投与したところ、投与 30 分後の出血時間はそれぞれ  $442 \pm 45$  秒、 $534 \pm 227$

秒と有意に短縮した。H12-(ADP)小胞体を投与してから180、360、540分後の出血時間を測定したところ、20 mg/kgではそれぞれ  $1123 \pm 467$ 、 $1259 \pm 646$ 、 $1517 \pm 330$  秒、40 mg/kgではそれぞれ  $674 \pm 341$ 、 $858 \pm 361$ 、 $1556 \pm 337$  秒と計測でき、投与6時間後までは、生理食塩水投与群と比較して有意に出血時間の短縮効果が維持できることが明らかとなった(Fig. 11 ▲, ●)。他方、生理食塩水あるいは(ADP)小胞体をそれぞれ20、40 mg/kgで投与しても出血時間の短縮は見られなかったことから(Fig. 11 □, △, ○)、止血におけるH12の必要性も再確認できた。

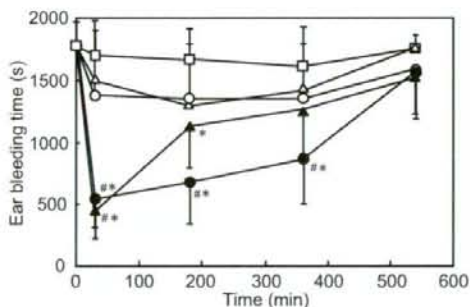


Fig. 11 Prolonged hemostatic abilities of H12-(ADP) vesicles at doses of 20 (▲), 40 (●) mg/kg. (ADP)vesicles at doses of 20 (△), 40 (○) mg/kg and saline (□) ear bleeding time (N=5-9). \*P<0.05 vs. saline group. #P<0.05 vs. (ADP)vesicle group.

H12-(ADP)小胞体を20、40mg/kgにて投与し、経時的に採血した後の上清の蛍光測定から血中濃度を測定したところ、Fig. 11に示す止血効果はH12-(ADP)小胞体の血中濃度推移(血中半減期  $T_{1/2}$ :  $522 \pm 30$  分)と相関しており、血中濃度を約  $100 \mu\text{g/mL}$  以上を保てば止血機能を維持できると算出された(Fig. 12)。

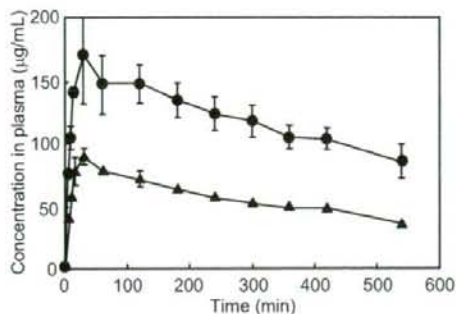
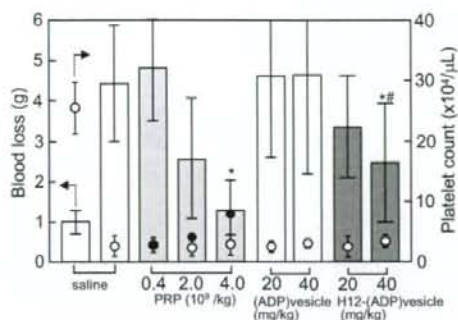


Fig. 12 Concentration of H12-(ADP)vesicles at doses of 20 (▲), 40 (●) mg/kg in plasma.

## 2.2. 腹部手術モデルを用いた止血能効果

血小板減少症モデルウサギに生理食塩水を投与したところ、出血量は  $4.4 \pm 1.5$  gであり、正常ウサギのそれ( $1.0 \pm 0.3$  g)と比較して約4.5倍増大した。陽性対照群としてウサギ血小板を  $0.4 \times 10^9$ 、 $2.0 \times 10^9$ 、 $4.0 \times 10^9$  PLT/kgで投与したところ、血小板数依存的に出血量を減少させ( $4.8 \pm 1.3$ 、 $2.6 \pm 1.5$ 、 $1.3 \pm 0.8$  g)、出血時間測定と相関する結果が得られた。そこで、H12-(ADP)小胞体を20、40 mg/kgで投与したところ、出血量はそれぞれ  $3.4 \pm 1.3$ 、 $2.5 \pm 1.5$  gであり、生理食塩水群と比較して有意に減少させ、血小板投与群に匹敵する効果を得た(Fig. 13)。他方、(ADP)小胞体投与群では減少効果は見られなかった(20 mg/kg:  $4.6 \pm 2.0$  g, 40 mg/kg:  $4.7 \pm 2.5$  g)。耳介周囲の出血時間測定では、20 mg/kgで血小板輸血群( $4.0 \times 10^9$  PLT/kg)に匹敵する効果であったのに対し、腹部手術モデルでは、投与量2倍(40 mg/kg)で血小板輸血群( $2.0 \times 10^9$  PLT/kg)の出血量と同等の効果と算出された。これは腹部手術モデルがより出血性の高い高侵襲な実験系であるためと考えられる。しかし、H12-(ADP)小胞体は腹部手術モデルにおいても出血量を顕著に減少させる効果が実証され、血小板減少患

者の外科手術への適応の可能性が示された。

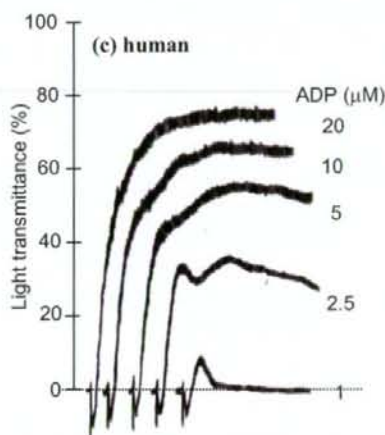
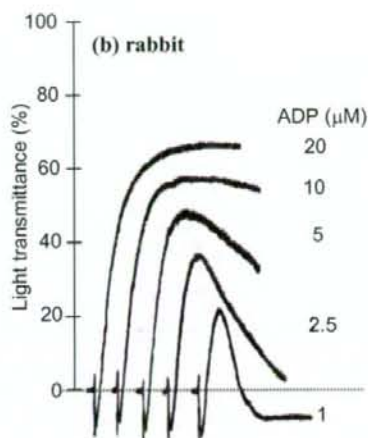
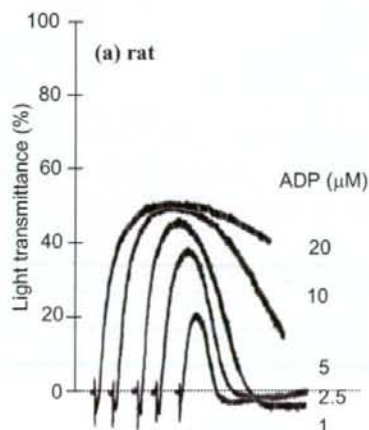


**Fig. 13** Effects of the administration of H12-(ADP)vesicles and PRP on blood loss of anterior abdominal wall. The administered amount of H12-(ADP)vesicles was 20, 40 mg/kg, and PRP was 0.4, 2.0, 4.0  $\times 10^9$ /kg. ○; platelet count in the rabbits before administration.; ●; platelet count in the rabbits after administration (N = 6-9). \*P<0.05 vs. saline group, #P<0.05 vs. (ADP)vesicles group. (30 minutes after injection)

### 2.3. ラット、ウサギ、ヒト血小板の種差の相違による ADP と H12 の反応性

#### 2.3.1. ADP の反応性

ラット PRP に ADP を添加し凝集させたところ、ADP 添加濃度の増大と共に透過率は上昇したが、2 次凝集には至らなかった (Fig. 14 (a))。ウサギ PRP も同様に 2 次凝集には至らなかったが、ラット PRP と比較して透過率は増大し、ADP の感受性が高いことが示された (Fig. 14 (b))。



**Fig. 14** ADP-induced platelet aggregation. (a) rat platelets, (b) rabbit platelets, and (c) human platelets. [platelet]:  $20 \times 10^4$  /μL.

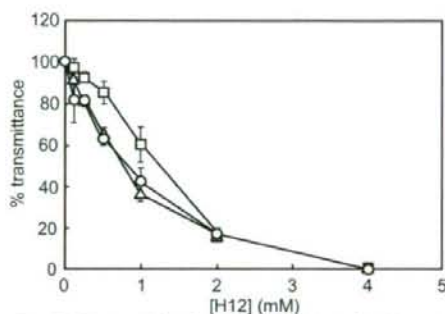
さらに、ヒト PRP では、2 次凝集まで亢進し、最も ADP 感受性が高いことが確認できた (Fig. 14 (c))。

Fig. 7、Fig. 9 に示すように、血小板減少ウサギの方が高い止血効果を示したのは、血小板の ADP に対する感受性の種差によるとも考えられる。

#### 2.3.2. H12 の反応性

PRP([PLT] =  $20 \times 10^4$  /μL)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  $\mu$ M)にて血小板凝集を惹起させたところ、H12 の添加濃度依存的に血小板凝集が阻害された(**Fig. 15**)。得られた結果の最大透過率から、ラット、ウサギ、ヒト血小板に対する H12 の IC<sub>50</sub> は、それぞれ 1.07、0.69、0.70 mM と算出できた。従って、ヒトとウサギの血小板に対する H12 の反応性はほぼ同等であり、ラットはわずかに低下することが確認できた。



**Fig. 15** Concentration-dependent inhibition of H12 to ADP stimulated platelets ( $20 \times 10^4 / \mu$ L). ( $\square$ ) rat platelets, ( $\triangle$ ) rabbit platelets, and ( $\circ$ ) human platelets. ADP: f.c. 20  $\mu$ M.

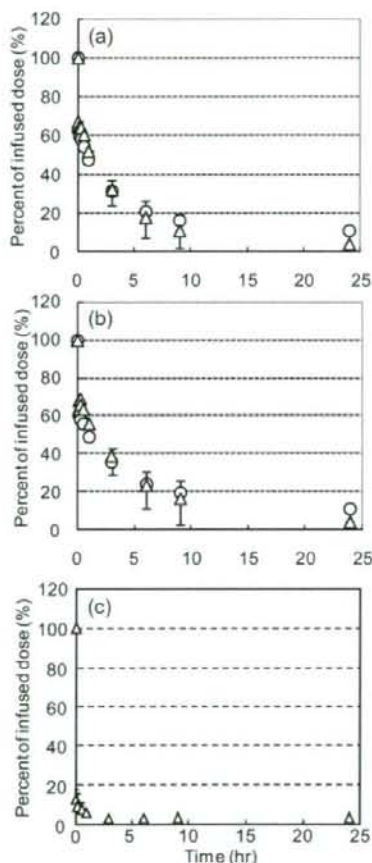
以上より、ウサギ血小板に対する ADP と H12 の反応性がヒト血小板と近い結果から、ウサギを用いた止血能評価はヒトを想定した評価に近いものであると判断できた。

### 3. RI 標識 H12-(ADP)小胞体の調製とその血中動態、臓器分布

#### 3.1. H12-(ADP)小胞体の血中濃度推移

Wister 雄性ラットに RI 標識 H12-(ADP)小胞体を 40 mg/kg にて投与後、経時的に採血し LSC 測定 ( $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$  の同時測定)したところ、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$  共に投与 6 時間まではほぼ同等の 2 相性の血中動態挙動を示し、その後徐々に両者の乖離が見られた(**Fig. 16 (a)**)。他方、(ADP)小胞体群でもほぼ同等の結果が得られ、H12-PEG-Glu2C18 の

有無に関わらず同等の血中動態を示すことを確認した(**Fig. 16 (b)**)。得られた血中濃度推移曲線から算出した ADP と cholesterol の血中動態パラメータ ( $T_{\alpha/2}$ ,  $T_{\beta/2}$ ,  $C_{\max}$ , CL,  $AUC_{24\text{hr}}$ )を以下に示す (**Table 1**)。



**Fig. 16** Percent of infused dose of (a) H12-(ADP)vesicles, (b) (ADP)vesicles at a dose of 40 mg/kg and (c) ADP solution administered into rats (N=5).  $\circ$ :  $^3\text{H}$  (Cholesterol),  $\triangle$ :  $^{14}\text{C}$  (ADP).

他方、ADP 水溶液投与では投与直後から速やかに血中から消失されたことから(**Fig. 16 (c)**)、H12-(ADP)小胞体投与群の  $^{14}\text{C}$  の挙動は(投与 6 時間まで)、小胞体に内包されている ADP を検出しており、ADP は小胞体に

安定に内包された状態で血中を滞留していると判断された。

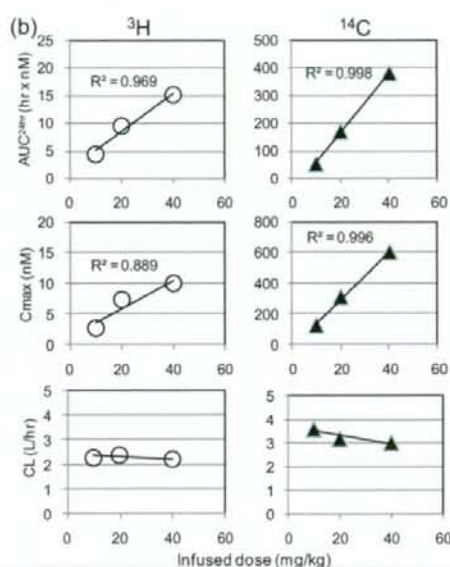
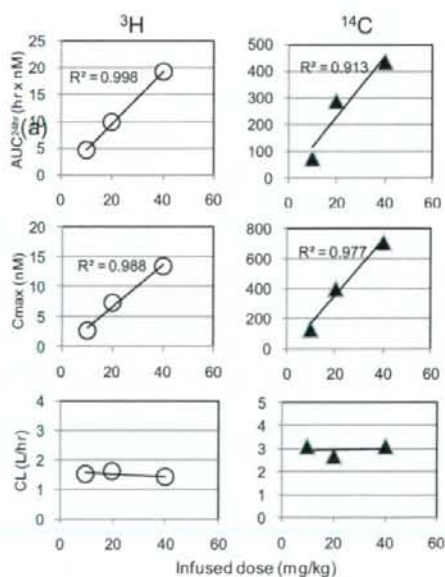
**Table 1** Pharmacokinetic parameters of H12-(ADP)vesicles and (ADP)vesicles at a dose of 40 mg/kg (N=5).

	H12-(ADP)vesicles	
	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C
T <sub>a1/2</sub> (hr)	1.8	2.2
T <sub>β1/2</sub> (hr)	30.1	12.4
AUC <sub>24hr</sub> (hr x nM)	19.2	434.5
C <sub>max</sub> (nM)	13.4	710
CL (L/hr)	1.4x10 <sup>-3</sup>	3.1x10 <sup>-3</sup>

	(ADP)vesicles	
	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C
T <sub>a1/2</sub> (hr)	2.1	2.2
T <sub>β1/2</sub> (hr)	30.3	12.4
AUC <sub>24hr</sub> (hr x nM)	15.1	380.8
C <sub>max</sub> (nM)	10.0	600
CL (L/hr)	1.3x10 <sup>-3</sup>	3.0x10 <sup>-3</sup>

次いで、RI 標識 H12-(ADP)小胞体、あるいは(ADP)小胞体を 10, 20 mg/kg にて投与後、経時的に採血し LSC 測定 (<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C の同時測定)たところ、Fig. 16 (a), (b)と同様の挙動を示した。



**Fig. 17** Pharmacokinetic parameters of (a) H12-(ADP)vesicles and (b) (ADP)vesicles at a dose of 10, 20, and 40 mg/kg (N=5).

各投与量における ADP と cholesterol の血中動態パラメータ(C<sub>max</sub>, CL, AUC<sub>24hr</sub>)を以下に示す(Fig. 17 (a), (b))。C<sub>max</sub>と AUC<sub>24hr</sub>は投与量に比例し、CL は投与量によらずほぼ一定であることから、40 mg/kg の H12-(ADP)小胞体を投与しても、小胞体の集積臓器として知られる脾臓、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。

## 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、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C とも顕著に脾臓へ集積し、次いで肝臓に集積した(Fig. 18 (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、<sup>99m</sup>Tm 標識した小胞体で得られた結果<sup>3)</sup>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. 18 (b))。他方、ADP 水溶液(1 mM)投与群では、 $^{14}\text{C}$  は速やかに尿中に排泄されることも確認でき、血中から瞬時に消失する理由を支持した。

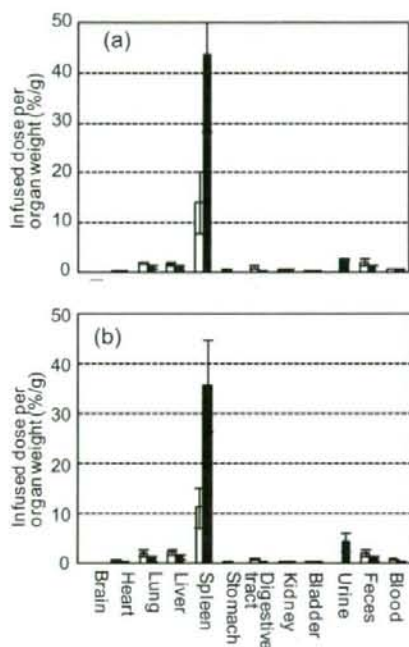


Fig. 18 Bio-distribution of (a) H12-(ADP)vesicles and (b) (ADP)vesicles at a dose of 40 mg/kg as percentage of the infused dose per gram of organ at 24 hr after administration into rat (N=5). □:  $^3\text{H}$  (Cholesterol), ■:  $^{14}\text{C}$  (ADP).

さらに興味深いことに、脾臓では  $^{14}\text{C}$  が  $^3\text{H}$  より多く集積し、肝臓では逆であった( $^3\text{H}$  が  $^{14}\text{C}$  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  $^3\text{H}$  と  $^{14}\text{C}$  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. 19, Fig. 20)。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、 $^{14}\text{C}$  が  $^3\text{H}$  よりも高値を示した。他方、肝臓では

$^3\text{H}$  が  $^{14}\text{C}$  よりも高値を示した。

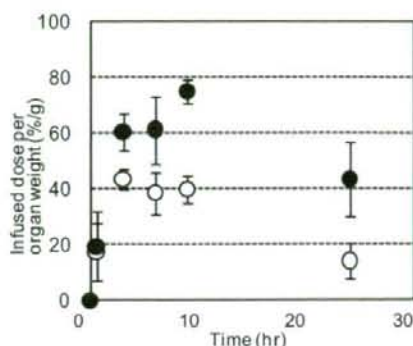


Fig. 19 Accumulation of H12-(ADP)vesicles to spleen at a dose of 40 mg/kg as percentage of the infused dose per gram of organ after administration into rat (N=5). ○:  $^3\text{H}$  (Cholesterol), ●:  $^{14}\text{C}$  (ADP).

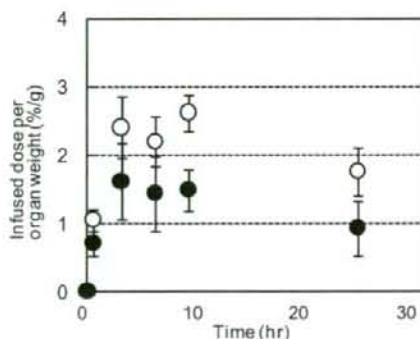


Fig. 20 Accumulation of H12-(ADP)vesicles to liver at a dose of 40 mg/kg as percentage of the infused dose per gram of organ after administration into rat (N=5). ○:  $^3\text{H}$  (Cholesterol), ●:  $^{14}\text{C}$  (ADP).

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  $^3\text{H}$  と  $^{14}\text{C}$  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 $^{14}\text{C}$ が $^3\text{H}$ 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、 $^3\text{H}$ (コレステロール→胆汁酸)は糞として排泄され、 $^{14}\text{C}$ (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. 21, 22)。

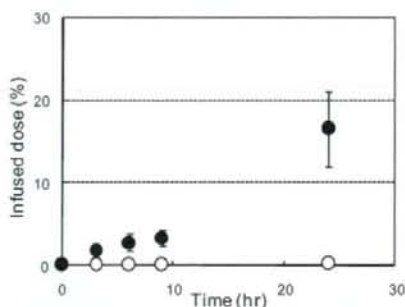


Fig. 21 Elimination of H12-(ADP)vesicles to urine as percentage of the infused dose after administration into rat (N=5). ○:  $^3\text{H}$  (cholesterol), ●:  $^{14}\text{C}$  (ADP).

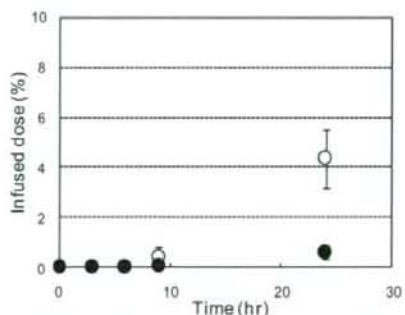


Fig. 22 Elimination of H12-(ADP)vesicles to feces as percentage of the infused dose after administration into rat (N=5). ○:  $^3\text{H}$  (cholesterol), ●:  $^{14}\text{C}$  (ADP).

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

## D. 結論

平成 18 年度

(1) H12-(CF)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 CF を放出させた。

(2) 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、血小板凝集を著しく促進させた。

(3) 血小板減少症モデルラットに 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-小胞体にて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。

(4) 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した。

平成 19 年度

(1) 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 時間後まで有意に短縮し、止血能の持続効果が証明できた。

(2) H12-(ADP)小胞体の止血能を発現する有効血中濃度は 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上であると算出された。

(3) 腹部手術モデルの出血量測定法を確立した。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短縮させ、血小板輸血群の出血抑制効果に匹敵した。

(4) ラット、ウサギ、ヒト血小板凝集に対する H12 の  $\text{IC}_{50}$  は、それぞれ 1.07、0.69、0.70

mM と算出できた。

平成 20 年度

(1) H12-(ADP)小胞体の投与 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( $T_{\alpha 1/2}$ :  $^3\text{H}$ : 1.8 hr,  $^{14}\text{C}$ : 2.2 hr,  $T_{\beta 1/2}$ :  $^3\text{H}$ : 30.1 hr,  $^{14}\text{C}$ : 12.4 hr)。その挙動は H12 の影響を受けないことが明らかとなった。

(2) 血中投与の H12-(ADP)小胞体は、主に脾臓に集積し、H12 の影響を受けないことが明らかとなった。

(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., Handa, H., Suzuki, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. New strategy of platelet substitutes for enhancing platelet aggregation at high shear rates; cooperative effects of a mixed system of fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide- or glycoprotein Iba-conjugated latex beads under flow conditions *J. Artif. Organs*. **9**, 251-258 (2006).

(2) 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司「血小板代替物の開発の現状」*人工血液* **13** (4), 155-160 (2006).

(3) Okamura, Y., Fujie, T., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. *Transfusion* **47**, 1254-1262 (2007).

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

(5) 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).

(6) 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).

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

(8) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Specific accumulation of iopamidol-encapsulated phospholipid vesicles carrying fibrinogen  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -chain dodecapeptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes. *Nanomedicine* (2009) to be submitted.

## 2. 学会発表

(1) 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 at Florida, USA (2006.5.).

(2) 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) at Tokyo, Japan. (2006.5.).

(3) 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 at San Francisco, USA (2006.9.12).

(4) 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).

(5) 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).

(6) 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).

(7) 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).

(8) 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).

(9) 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).
- (10) 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).
- (11) 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).
- (12) 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 at Geneva, Switzerland (2007.7.).
- (13) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., and Ikeda, Y. Hemostatic 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 at Geneva, Switzerland (2007.7.).
- (14) Fujie, T., Okamura, Y., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolonged hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress at Geneva, Switzerland (2007.7.).
- (15) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. American Chemical Society 234nd National Meeting & Exposition at Boston, USA (2007.8.).
- (16) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y. Hemostatic effects of liposomes bearing fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide amplified by encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitutes. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs at Osaka, Japan (2007.10.).
- (17) 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).
- (18) 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'-ニリン酸)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).
- (19) 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).
- (20) 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).

(21) 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).

(22) 鈴木 英紀, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「トロンビン刺激による 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).

(23) Okamura, Y., Takeoka, S., Maekawa, I., Eto, K., Ikeda, Y., and Handa, M. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -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.).

(24) 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.).

(25) Handa, M., Okamura, Y., Takeoka, S., and Ikeda, Y. Fibrinogen  $\gamma$ -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.).

(26) 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).

(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) 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).

(29) 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).

(30) 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

(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.

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

血小板減少モデルウサギを用いた止血能評価系の確立と  
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】**

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アルブミン重合体(H12-PEG-polyAlb)やリン脂質小胞体(H12-小胞体)は、活性化した血小板の表面に発現される GPIIb/IIIa を認識、架橋して血小板凝集を促進させる機能を有し、血小板減少ラットの出血時間を短縮させることを明らかにしてきた。

平成 18 年度は、血小板減少症モデルウサギを作製し、その止血能評価系を確立することを目的とした。抗がん剤(ブスルファン)の副作用を利用して 30 mg/kg を下腹部皮下投与することで、正常値の 1/20 まで血小板数が減少した重篤な血小板減少モデルウサギの作製法を確立できた。この重篤な血小板減少モデルウサギでも、H12-PEG-polyAlb は有意に出血時間を短縮させる粒子であることも実証できた。さらに、血小板の輸血モデルの確立に成功し、血小板代替物の止血能力価の指標とすることが可能となった。

平成 19 年度は、造影剤(*N,N'*-Bis[2-hydroxy-1-(hydroxylmethyl)ethyl]-5-[(2*S*)-2-hydroxylpropanoylamino]-2,4,6-triiodoisophthalamide (Iopamidol: IOP))を内包した H12-(IOP)小胞体を新規に調製し、実験小動物用 X 線コンピュータ断層撮影法(computed tomography (CT))を用いてラット尾静脈の出血部位、あるいは頸静脈の塩化鉄傷害血栓に対する特異的集積性を検討した。H12-小胞体は IOP を効率良く内包でき、4 日後でも IOP を安定に内包させることを確認した。この H12-(IOP)小胞体をラットに投与し、尾静脈の出血部位や頸静脈の塩化鉄傷害部位を CT 観察したところ、傷害部位のみが造影され、生理食塩水投与群、IOP 水溶液投与群、(IOP)小胞体群では造影されなかった。従って、H12-小胞体は出血部位に対して特異的に集積することを *in vivo* 試験で初めて証明できた。さらに、H12-(IOP)小胞体を投与 1 時間後の CT 観察により、脾臓・肝臓へ集積することも確認した。

平成 20 年度は、放射性同位元素(RI,  $[8-^{14}\text{C}]\text{ADP}$ ,  $[1,2-^3\text{H}]\text{cholesterol}$ )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、保存時には 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

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アルブミン重合体(H12-PEG-polyAlb)やリン脂質小胞体(H12-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有し、血小板減少ラットの出血時間を短縮させることを明らかにしてきた<sup>1),2)</sup>。

平成 18 年度では、より大型の動物(ウサギ)を用いて血小板代替物の止血能評価を行うために、血小板減少症モデルウサギを作製法し、H12-PEG-polyAlb の止血能評価を行った。新たに血小板輸血モデルを確立し、H12-PEG-polyAlb の止血能力価の指標とした。

平成 19 年度は、造影剤(*N,N'*-Bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-[(2*S*)-2-hydroxypropanoylamino]-2,4,6-triiodoisophthalamide (Iopamidol: IOP, Mw: 777) (Fig. 1)を内包した H12-(IOP)小胞体を調製し、実験小動物用 X 線コンピュータ断層撮影法(computed tomography (CT))を用い

てラット尾静脈の出血部位、あるいは頸静脈の塩化鉄傷害血栓に対する特異的集積性を検討した。

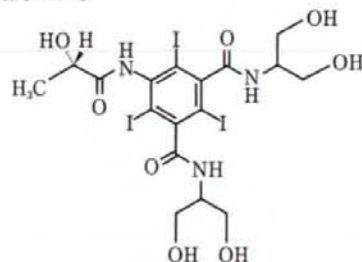


Fig. 1 Chemical structure of Iopamidol.

さらに、H12-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<sup>2)</sup>。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、その放出を証明できていなかった。

平成 20 年度は、放射性同位元素(RI,  $[8-^{14}\text{C}]\text{ADP}$ ,  $[1,2-^3\text{H}]\text{cholesterol}$ )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 放出特性の相関を明らかにすることを目的とした。

- 1) Okamura, Y. *et al. Bioconjugate Chem.*, **16**, 1589-1596 (2005).
- 2) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* **7**, 470-477 (2009).

## B. 研究方法

### 1. 血小板減少モデルウサギを用いた評価法 (平成 18 年度)

#### 1.1. 血小板減少ウサギの作製法

ニュージーランドホワイต์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(2%)の混合溶液(ケタミン/セラクター = 3/1 (v/v), 2 mL)にて麻酔後、プスルファン 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, 40, 50 mg/kg)。耳静脈より 23G 注射針で経時的に採血し、血球測定装置(K-4500, Sysmex)にて各血球を測定した。

#### 1.2. 出血時間測定法

投与開始後 15 日目の血小板減少ウサギ([PLT] =  $2.6 \pm 0.8 \times 10^4$  / $\mu$ L)に、方法 1 と同容量のケタミン/セラクターを麻酔後、23G 翼状針を装着したシリンジポンプを用いて検体(H12-PEG-polyAlb、生理食塩水)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。

#### 1.3. 血小板輸血

ウサギ全血(1/10 (v/v) ACD 水溶液)を遠心分離して(100g, 15 min, r.t.)、多血小板血漿

(PRP)を得た。さらに PRP を遠心分離し(2,200g, 7 min, r.t.)、あらかじめ調製しておいた貧血小板血漿(PPP)にて、目的の血小板数になるように調整して再分散させた([PLT] =  $10$ - $100 \times 10^4$  / $\mu$ L)。方法 1.2. と同様に、23G 翼状針を用いて PRP ([PLT] =  $(10$ - $100) \times 10^4$  / $\mu$ 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、外科用メス(No. 11)を用いて切傷し(長さ 6 mm)、出血時間を測定した。同時に、耳静脈より 23G 注射針で経時的に採血し、血小板数を測定した(K-4500)。

#### 1.4. polyAlb の調製法

250 mg/mL リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA, 三菱ウェルファーマ社製)を純水に対して透析し(6 hr, r.t.)、安定化剤を除去した。生理食塩水にて希釈した rHSA 水溶液(10 mg/mL, 400 mL)に、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を添加(12.8 mL)、攪拌して(30 min, r.t.)、pH10.7 とした。続いて 80°C にて 10 分間攪拌後、氷浴中にて急冷した。これに、0.1 M 塩酸水溶液(14.4 mL)を滴下後、40°C にて 2-3 時間攪拌した。経時的に分取し 700 nm の吸光度( $\Delta$ O.D.)を検出し、粒径約 250nm 程度の polyAlb を調製した。

#### 1.5. H12-PEG-polyAlb の調製法

polyAlb の PEG 表面修飾には、以下の 2 種類の PEG 誘導体を用いた(日本油脂製)。 $\alpha$ -(3-[3-maleimido-1-oxopropyl]amino) propyl- $\omega$ -succinimidyl carboxypentyl poly(ethylene glycol) (MALPEG-NHS, Mw: 5.0 kDa)、 $\alpha$ -methoxy- $\omega$ -succinimidyl carboxypentyl poly(ethylene glycol) (mPEG-NHS, Mw: 5.0 kDa)。

polyAlb 分散液([rHSA]=15 mg/mL, 250 mL, 粒径  $240 \pm 100$  nm)に MALPEG-NHS DMSO 溶液(10 mM, 7.38 mL)を添加、振とう後(20 min, r.t.)、引き続き mPEG-NHS DMSO 溶液(25 mM, 8.85 mL)を添加した。遠心分離(30,000g, 20 min)にて精製後、PEG-polyAlb ([rHSA]=21 mg/mL, 70 mL)を得た。Cys をあらかじめ導入した H12(100 mM, 292  $\mu$ L)を混合して振とう後(12 hr, r.t.)、遠心分離(30,000g, 10 min)にて H12-PEG-polyAlb ([rHSA]=30 mg/mL, 15 mL)を回収した。

## 2. CT を用いた H12-小胞体の出血部位への特異的集積性評価法 (平成 19 年度)

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

#### 2.1.1. 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。

#### 2.1.2. 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  $\mu$ mol)、TEA (122.5  $\mu$ L, 880  $\mu$ mol)を

添加後、MALPEG-NHS (Mw:3400, 1.5 g, 279  $\mu$ mol)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。

### 2.1.3. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18)の合成

MAL-PEG-Glu2C18 (1000 mg, 253.7  $\mu$ mol)と C 末端にシステインを結合させた H12 (328 mg, 253.7  $\mu$ mol)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。

### 2.2. H12-(IOP)小胞体の調製法

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl choline (DPPC) (1000 mg, 1.36 mmol)、cholesterol (527 mg, 1.36 mmol)、1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSGL) (190 mg, 136  $\mu$ mol)、PEG-DSPE (47.4 mg, 8.17  $\mu$ mol)、H12-PEG-Glu2C18 (43.4 mg, 8.17  $\mu$ mol)をベンゼンに溶解し、凍結乾燥させた (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18=5/5/1/0.03/0.03, モル比)。IOP 水溶液(80 mM)にて水と和させ、エクストルーション法を用いて H12-(IOP)小胞体を調製した(粒径  $250 \pm 80$  nm)。超遠心分離後(100,000g, 30 min, 4°C)、PBS 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

量に残存している IOP を完全に除去した。

### 2.3. IOP 内包安定性試験

H12-(IOP)小胞体(10 mg/mL)を4°Cにて保存した後、経時的に採取した。ゲルろ過(Sephadex G25)後、2% (v/v)ラウリルエーテル水溶液にて可溶化し(50°C, 5 min)、高速液体クロマトグラフィー(TSKGel G3000PW<sub>XL</sub>, 1 mL/min, Ab. 240 nm)を用いて残存 IOP を定量し、脂質濃度(リン脂質テストワコー)で補正することで IOP 内包率を測定した。

### 2.4. CT を用いた H12-(IOP)小胞体の特異的集積性評価法

Wister 系雄性ラット(三協ラボサービス(株), 8 週齢, 250-300 g)をネブタール麻酔下、H12-(IOP)小胞体を尾静脈投与した(脂質重量換算: 130 mg/kg)。また、生理食塩水、IOP 水溶液、(IOP)小胞体を陰性対照群とした。投与 5 分経過後、尾先端から 1 cm の部位にメス(No. 11)を用いて切傷し(長さ 1 cm)。止血するまで尾先端を生理食塩水中に浸した。犠牲死させた後、CT(eXplore Locus<sup>TM</sup>, GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)にて尾を観察した。

他方、Wister 雄性ラット(250-300 g)の頸部を切開し、頸静脈を露出させ、その下にパラフィルム(20 x 6 mm)および濾紙(10 x 5 mm)を敷いた(Fig. 2)。H12-(IOP)小胞体を尾静脈より投与し(130 mg/kg)、5 分後に 35% 塩化鉄水溶液 10 $\mu$ L を濾紙に吸収させた。添加 30 分後に犠牲死させ、CT により撮影した。

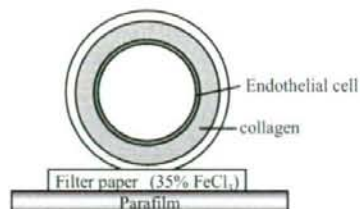


Fig. 2 Schematic image of ferric chloride-induced thrombosis model.

## 3. H12-(ADP)小胞体の膜物性と ADP 放出特性の相関性 (平成 19 年度)

### 3.1. 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))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)-(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、外水相に微量に残存する 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 <sup>1)</sup>	5	-	-	-
DPPC <sup>2)</sup>	-	5	-	5
DSPC <sup>3)</sup>	-	-	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<sub>m</sub>): 1) 23 °C, 2) 41 °C, 3) 55 °C

### 3.2. RI 標識 H12-(ADP)小胞体の調製法

各混合脂質(Table 1)を [8-<sup>14</sup>C]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-<sup>3</sup>H]cholesterol (20  $\mu$ M, 25  $\mu$ L; 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。

### 3.3. H12-(ADP)小胞体の被覆層数の算出

各種 H12-(ADP)小胞体 ([lipid]=f.c. 9 mg/mL)に PEG 水溶液 ( $M_w=100$  kDa)を添加 (f.c. 10 mg/mL)、ボルテックスにて攪拌後、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 ( $m^3$ )

V: 小胞体1粒子の表面積 ( $m^2$ )

P: 分子占有面積 ( $m^2$ )

### 3.4. 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 prostagrandin  $E_1$  ( $PGE_1$ , f.c. 1  $\mu$ M)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  $\mu$ M  $PGE_1$ )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]= $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, 25  $\mu$ L)に DiOC<sub>18</sub> 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  $\mu$ M)にて血小板を活性化させて振とう (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を行った。

### 3.5. 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]= $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L)に各種 H12-(ADP)小胞体 (f.c. ca.  $1 \times 10^9$  particles)を添加、攪拌後、ADP (f.c. 3  $\mu$ M)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を観察した(分担研究者: 鈴木英紀博士と共同)。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、ショ糖水溶液中(1 M)に1時間、さらにショ糖水溶液中(2.3 M)に終夜浸漬した。この試料を凍結用試料ピ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。

### 3.6. RI 標識 H12-(ADP)小胞体を用いた ADP 放出率測定法

3.5.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<sup>®</sup> (2 mL, PerkinElmer 製)にて可溶化後、Hionic Fluor<sup>®</sup> (15 mL, PerkinElmer 製)を添加し液体シンチレーションカウンター (LSC)